

Viviane Kelly Alves Sousa

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA MOLECULAR PARA
AVALIAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HGV/GBV-C EM
PACIENTES CO-INFECTADOS PELO HIV-1**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.**

**São Paulo
2008**

Viviane Kelly Alves Sousa

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA MOLECULAR PARA
AVALIAÇÃO DA CARGA VIRAL DE HGV/GBV-C EM
PACIENTES CO-INFECTADOS PELO HIV-1**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.**

Orientador: Prof. Dr. Celso Francisco Hernandes Granato

Co-orientadora: Dra. Shirley Cavalcante Vasconcelos Komninakis

São Paulo

2008

Sousa, Viviane Kelly Alves

Desenvolvimento de técnica molecular para avaliação da carga viral do HGV/GBV-C em pacientes co-infectados pelo HIV-1. / Viviane Kelly Alves
Sousa. – São Paulo, 2008.

xv, 62.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Infectologia.

Título em inglês: Development of a molecular technique to evaluate HGV/GBV-C viral load in HIV-1 co-infected patients.

1. Vírus GB-C
2. Infecção por HIV
3. Hepatite viral Humana
4. PCR em Tempo Real

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Emilia Inoue Sato

Chefe da Disciplina: Prof. Dr. Sérgio Barsanti Wey

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob projeto de número 05/57611-5.

Dedicatória

Ao meu marido, Fabiano, pelo amor e paciência durante esses anos e por sempre me incentivar acreditando nos meus ideais. Ao meu pai, José Alves, pelo amor incondicional e tantos ensinamentos. Ao meu irmão Kleber pelo carinho e convivência.

Agradecimentos

A Deus, por não me deixar fraquejar e por me acompanhar ao longo desta jornada.

Ao professor Dr. Celso Francisco Hernandes Granato pela oportunidade de realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Shirley Cavalcante Vasconcelos Komninakis por toda a ajuda e colaboração, pela paciência, discussão e ensinamentos e, sobretudo, pelo exemplo de pesquisadora.

Aos meus pais, José Alves e Ana Maria, e à minha madrinha Magali um agradecimento especial pelas orações e pelo orgulho que sente com cada uma de minhas conquistas.

Ao meu marido Fabiano agradeço por todo o carinho, compreensão e apoio durante esses anos de trabalho participando da minha luta e jamais me deixando desanimar. Obrigada por perdoar os tantos momentos de ansiedade.

Aos meus amigos dos laboratórios de Virologia e Imunologia I: Maria, Leandro, Taís, Marialice, Aline, Giovana, Natália, Sidnéia, Ellen, Aripuanã, Sandra, Amanda, Emerson, Graziela, Bianca, Elaine e Elaine. E também à Antônia, secretária dos laboratórios. Obrigada por todo o carinho, pelos ouvidos e incentivo nos momentos difíceis, participação e companheirismo. Quero deixar um agradecimento especial à Giovana e à Natália, pela ajuda na finalização deste trabalho. Obrigada, meninas!!! Sem vocês, acho que não conseguiria... E também um obrigada especial para a amiga e supervisora Milena, pela paciência e pelo profissionalismo em lidar com as questões de organização dos laboratórios.

Aos meus amigos do laboratório de Retrovirologia, no qual passei a maior parte do desenvolvimento deste trabalho, pelo carinho, paciência e tolerância na utilização do mesmo espaço sem discriminação por eu não ser do laboratório. Um obrigado especial ao Wagner que me ajudou em muitas etapas na realização deste trabalho.

Um agradecimento especial ao Charlys, secretário do laboratório de Retrovirologia, que embora em alguns momentos eu tenha vontade de matá-lo (risos) me ajudou muito com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do laboratório ALERTA: Danilo, Anderson, Adriana, Heloísa e Renata, pelas muitas conversas e discussões, pela troca de experiências e de materiais, por toda paciência e ajuda nos momentos desesperadores... vocês foram muito importantes para a realização deste trabalho. Obrigada de coração!!!

Ao Profº Dr. José Eduardo Levi, do Instituto de Medicina Tropical da USP, quero agradecer pela doação do controle positivo necessário para o início dos experimentos deste trabalho.

Ao Carlos, do Centro de Genomas, pelas discussões e conversas científicas que me ajudaram a crescer como profissional.

Aos voluntários que aceitaram participar deste estudo.

Às minhas amigas Paula e Paula por todo apoio, boas conversas e momentos divertidos. Vocês são as irmãs que eu pude escolher!!!

Aos meus familiares, por todos os momentos bons que dividimos.

A todos os que participam de minha vida, mas não foram mencionados. Obrigada a todos!!!

Quando alguém encontra seu caminho precisa ter coragem suficiente para dar passos errados. As decepções, as derrotas, o desânimo são ferramentas que Deus utiliza para mostrar a estrada.

Paulo Coelho

DAS UTOPIAS

*Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!*

Mário Quintana

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Lista de Tabelas	x
Lista de Quadros	xi
Lista de Figuras	xii
Lista de Abreviações	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xv
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Vírus da Hepatite G ou Vírus GB-C	01
1.2 Reação da PCR em Tempo Real	15
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Amostras	20
3.2 Reagentes e Equipamentos	21
3.3 Estudo da região genômica para o desenho dos <i>primers</i>	23
3.4 Padronização da PCR qualitativa	23
3.4.1 Extração de RNA da amostra	24
3.4.2 Reação de Transcrição Reversa	25
3.4.3 Reação da PCR	25
3.5 Clonagem molecular e Transformação bacteriana	26
3.5.1 Produção de bactérias eletrocompetentes	26
3.5.2 Obtenção de plasmídeo recombinante	26
3.5.3 Verificação da orientação do inserto	28
3.6 Linearização do plasmídeo e transcrição <i>in vitro</i>	29
3.7 Padronização da PCR em Tempo Real	31
3.7.1 Reação de transcrição reversa	31
3.7.2 Reação da PCR em Tempo Real	31
3.7.3 Obtenção do controle positivo	32
3.8 Demais testes laboratoriais	33
3.8.1 Carga Viral do HIV	33
3.8.2 Contagem de linfócitos T CD4+ e T CD8+	33
3.9 Análise dos Resultados	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1 <i>Primers</i> para o Sistema da PCR em Tempo Real	35
4.2 Padronização da curva para a PCR em Tempo Real	36
4.3 Controle Positivo	40
4.4 Amostras	41
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÕES.....	51
7. ANEXOS.....	52
8. REFERÊNCIAS.....	55

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Reagentes utilizados na realização do trabalho	21
Tabela 2.	Equipamentos utilizados na realização do trabalho	22
Tabela 3.	Perfil imunológico e virológico do grupo de pacientes infectados somente pelo HIV ou co-infectados pelo HCV.....	42
Tabela 4.	Perfil imunológico e virológico do grupo de pacientes infectados somente pelo HIV ou co-infectados pelo HCV com presença do anticorpo anti-E2 de HGV/GBV-C.....	42
Tabela 5.	Perfil imunológico e virológico do grupo de pacientes infectados somente pelo HIV ou co-infectados pelo HCV e positivo para a presença de RNA de HGV/GBV-C (triplamente infectados).....	42
Tabela 6.	Perfil imunológico e virológico do grupo de pacientes triplamente infectados (HIV/HCV/HGV-GBV-C) e com presença do anticorpo anti-E2 do HGV/GBV-C.....	42

Lista de Quadros

- Quadro 1.** Cts de amplificação para cada ponto da curva com diluição de fator 10 36
- Quadro 2.** Valores de Cts para os ensaios de padronização com titulação de MgCl_2 37
- Quadro 3.** Valores de Cts para os ensaios de padronização com diferentes concentrações de primers 38
- Quadro 4.** Valores de Cts para curva padronizada e o cálculo do coeficiente de variação para cada ponto da curva 39

Lista de Figuras

- Figura 1.** Foto de gel de agarose a 1,5%, ilustrando amplificação de produto de PCR de 89 pb 36
- Figura 2.** Gráfico do sistema de quantificação da PCR em Tempo Real 37
- Figura 3.** Gráfico da curva de diluição seriada em fator 10 com MgCl_2 na concentração de 6,5mM 38
- Figura 4.** Gráfico da curva de quantificação absoluta padronizada em quadruplicatas 39
- Figura 5.** Gráfico da quantificação de 20 alíquotas de controle positivo 40

Lista de abreviações

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
Anti-E2	Anticorpos contra a proteína E2 do envelope do HGV/GBV-C
AUG	códon de iniciação da tradução de proteínas
CCR5	co-receptor celular da a infecção pelo HIV
CD19+	marcador de superfície celular de células B
CD4+	Marcador de superfície celular de células T auxiliares
CD8+	Marcador de superfície celular de células T citotóxicas
CXCR4	co-receptor celular da a infecção pelo HIV
DNA	ácido desoxirribonucléico
E1	Proteína estrutural do HGV/GBV-C
E2	Proteína estrutural do HGV/GBV-C
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
GBV-A	Vírus GB-A
GBV-B	Vírus GB-B
GBV-C	Vírus GB-C (ou HGV, vírus da hepatite G)
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HGV	Vírus da Hepatite G (ou GBV-C)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IL	Interleucina
LB	Meio Lúria-Bertani
NS3	região genômica do HGV/GBV-C que codifica a helicase viral
NS5B	região genômica do HGV/GBV-C que codifica a RNA polimerase
ORF	"open reading frame"
PBMCs	células mononucleares do sangue periférico
PCR	reação em cadeia da polimerase
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase com etapa de transcrição reversa
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
TBE	tampão tris-borato-EDTA
Tris	trishidroximetilaminometano
TSB	Meio Tryptic Soy Broth

Resumo

Introdução: A infecção pelo HGV/GBV-C é comum em humanos e pode persistir por anos sem apresentar sintomas clínicos evidentes. O HGV/GBV-C é um membro da família *Flaviviridae*, que possui RNA de fita simples com polaridade positiva, e é fortemente relacionado ao vírus da Hepatite C (HCV). Estudos recentes sugerem que a infecção pelo HGV/GBV-C em pessoas HIV-positivas está associada com uma progressão mais lenta para a AIDS, indicando uma menor carga viral do HIV e uma maior contagem de células T CD4+ nesses indivíduos, embora muitos estudos tenham falhado em demonstrar tais efeitos benéficos.

Objetivos: Padronização da técnica de PCR em Tempo Real para estimar a prevalência e a carga viral do HGV/GBV-C entre os pacientes infectados pelo HIV, comparando os pacientes que apresentam infecção somente pelo HIV e os co-infectados pelo HGV/GBV-C em termos de carga viral do HIV e contagem de células T CD4+.

Métodos: A região genômica do HGV/GBV-C escolhida para o desenvolvimento do estudo foi a 5'UTR. Foi necessária a realização de uma clonagem molecular para obtenção de um plasmídeo recombinante e produção de grande quantidade deste por meio de uma transformação bacteriana em cepa DH10B. O plasmídeo recombinante foi linearizado e submetido à transcrição *in vitro* para obtenção e quantificação de RNA sintético para a construção da curva de quantificação absoluta do sistema da PCR em Tempo Real. Os pacientes foram submetidos ao ensaio e seus resultados comparados à curva padrão para obtenção das cargas virais.

Resultados: Uma diluição seriada em fator 10 do RNA sintético produziu uma curva de quantificação com 9 ordens de magnitude, numa faixa de 10^2 a 10^{10} genômas equivalentes/ul. Para o ensaio, a inclinação da reta foi de -3,56, o intercepto foi de 45,56, o coeficiente de correlação de Pearson foi de $r^2 = 0,99$ e a eficiência da reação foi de 90,9%. A reprodutibilidade do teste foi avaliada com base numa reação em quadruplicata da curva de quantificação com média de coeficiente de variação de 1,2%. Foram incluídos 102 pacientes no estudo, onde 57,8% do sexo masculino e com média de idade de 42 ± 9 anos. Do total, 21% dos pacientes eram positivos para a presença de RNA de HGV/GBV-C no plasma com média de carga viral de 300.455 cópias/mL, e para o anticorpo anti-E2, 26,4% eram positivos. Não houve diferença estatística quanto às médias de carga viral do HIV-1 e contagem de células T CD4+ quando comparados pacientes infectados somente pelo HIV, co-infectados pelo HGV/GBV-C ou com presença de anticorpos anti-E2. Houve fraca correlação negativa quando comparadas as cargas virais do HIV e do HGV/GBV-C.

Conclusões: A padronização da técnica de PCR em Tempo Real pôde ser realizada e está de acordo com dados de outros trabalhos realizados na mesma área. Assim como descrito na literatura, existe alta prevalência de infecção pelo HGV/GBV-C entre os indivíduos infectados pelo HIV (21%). A fraca correlação negativa entre as cargas virais do HIV e do HGV/GBV-C confere com dados da literatura podendo sugerir efeito benéfico em relação à progressão para a AIDS, entretanto, outros fatores também podem estar relacionados e mais estudos nessa área são necessários para melhor entendimento dessa interação viral.

Abstract

Introduction: The HGV/GBV-C infection is frequent in humans and could last for years without evident clinical symptoms. HGV/GBV-C is a member of the *Flaviviridae* family strongly associated with the hepatitis C virus and composed by a single positive RNA strain. Recent studies suggest that HGV/GBV-C infection in HIV seropositive patients is associated with a delayed progression to AIDS, lower HIV viral load and a higher CD4 T-cell count, however, some studies failed to demonstrate such beneficial effects in these patients.

Objectives: The aim of this study was to standardize a real time PCR to estimate the prevalence and HGV/GBV-C viral load among the HIV seropositive patients, comparing HIV monoinfected and co-infected in terms of T CD4 cell count and HIV viral load.

Methods: To achieve this purpose, the 5'UTR genomic region of HGV/GBV-C was selected. A molecular cloning was needed in order to obtain a recombinant plasmid and a high production of this plasmid through a bacterial cloning in DH10B strain. The recombinant plasmid was linearized and submitted to *in vitro* transcription to obtain and to quantify synthetic RNA to construct the absolute quantification curve of the real time PCR system. The patient samples were submitted to the assay and the results were compared to the standard curve in order to obtain the HGV/GBV-C viral load.

Results: A serial dilution of the synthetic RNA in factor 10 produced a quantification curve with 9 orders of magnitude, varying from 10^2 to 10^{10} genome equivalent/ μ L. To the assay, the inclination of the straight line was -3.56, the intercept was 45.56, the Pearson correlation coefficient was $r^2=0.99$ and the efficiency of the reaction was of 90.9%. The reproducibility of the assay was evaluated based on a quadruplicate reaction of the quantification curve with a mean coefficient of variation of 1.2%. 102 patients were included in the study, mean age of 42 ± 9 years and 57.8% of them were man. From the total cohort, 21% were positive to HGV/GBV-C RNA in the plasma, with a mean viral load of 300.455 copies/mL and 26.4% were positive to anti-E2 antibodies. There were no statistical significance in regard to the CD4 T-cell count and HIV viral load when comparing HIV monoinfected patients with that co-infected with HGV/GBV-C ($p=0,297$) and a weak negative correlation was observed between HIV and HGV/GBV-C viral loads (Spearman's $\rho = -0,237$).

Conclusions: The standardization of the real time PCR could be done and is in agreement with other published studies. According to the literature data, there is a high prevalence of the HGV/GBV-C infection among HIV seropositive patients. The weak negative correlation between HIV and HGV/GBV-C viral load is in agreement with previous publications, suggesting a beneficial effect regarding to AIDS progression, however, other factors can be associated and future studies are needed to better understand this viral interaction.

1. Introdução

1. Introdução

Vírus da Hepatite G ou Vírus GB-C

Em 1967, Deinhardt e colaboradores⁽¹⁾, na tentativa de acompanhar animais de experimentação para o estudo de hepatites virais, inocularam em sagüis o soro de um cirurgião de 34 anos (cuja inicial era G.B.), que se encontrava no terceiro dia de um quadro de hepatite. O soro desses animais, que no seguimento apresentaram testes de função hepática anormais, foi inoculado em passagens seriadas em outros sagüis que, da mesma forma, desenvolveram a doença.

Anos mais tarde, em 1995, Simmons e colaboradores⁽²⁾ utilizaram amostras de soro originadas de um “pool” de soros de sagüis que continham o que eles chamavam de “agente GB”, para inocular novamente alguns sagüis, que desenvolveram hepatite. Esses autores identificaram nesses animais dois genomas virais distintos, os quais denominaram GBV-A e GBV-B. A caracterização destes dois vírus revelou que eles apresentavam entre si 27% de homologia nas suas seqüências de aminoácidos e 28% de semelhança com o vírus da Hepatite C do tipo 1 (HCV-1) nas regiões NS3 (que codifica a helicase viral) e NS5B (que codifica a RNA polimerase RNA-dependente)⁽³⁾.

Logo a seguir, o mesmo grupo de Simmons⁽⁴⁾ conduziu um estudo com duas populações consideradas de “alto risco” para exposição aos vírus das hepatites e isolou um novo vírus, designado GBV-C, porque suas seqüências eram intimamente relacionadas aos vírus GBV-A e GBV-B. Como o GBV-C foi identificado em pacientes com evidência clínica de hepatite, mas sem evidência de infecção pelos vírus das hepatites A, B, C, D ou E, esse vírus foi relacionado como agente causador de hepatite humana de etiologia desconhecida.

Pouco tempo depois, outro grupo descreveu um novo vírus causador de hepatite não-A, não-E que foi isolado de pacientes com hepatite crônica e foi denominado de vírus da hepatite G ou HGV⁽⁵⁾. Neste estudo, a infecção pelo HGV foi demonstrada em pacientes com hepatite crônica que apresentavam cirrose confirmada por biópsia; nesses pacientes excluiu-se o diagnóstico de infecção pelo HBV e HCV. Além disso, esse estudo mostrou que havia 96% de homologia

entre os genomas do GBV-C e do HGV, indicando que, de fato, tratava-se de dois isolados do mesmo vírus.

Filogeneticamente, o HGV/GBV-C está classificado como membro da família *Flaviviridae*, assim como o GBV-A, GBV-B e o HCV. Possui homologia de 30% nas mesmas regiões do genoma com o HCV do tipo 1, porém é mais intimamente relacionado ao vírus GBV-A (apresentando 59% de homologia nas seqüências de nucleotídeos e 64% nas seqüências de aminoácidos). Foi observada, por meio de análises das seqüências desses vírus, que a região de maior semelhança entre eles é aquela que codifica a helicase viral^(5,6). Além disso, as semelhanças nas seqüências de aminoácidos entre HGV/GBV-C e o HCV-1 ocorrem dentro das regiões NS3 e NS5B as quais, presume-se, que em ambos os vírus codifiquem a helicase e a RNA polimerase viral, respectivamente⁽⁶⁾.

Outros membros da família *Flaviviridae* que podem infectar humanos incluem o vírus da febre amarela (YFV), dengue (DF), encefalite japonesa (JEV) e vírus do Oeste do Nilo (WNV). Viroses de animais dentro do gênero *Pestivirus*, incluem o vírus da febre suína clássica (CSFV) e o vírus da diarreia viral bovina (BVDV)⁽⁷⁾.

Assim como o HCV, o HGV/GBV-C é um vírus RNA de fita simples com polaridade positiva e seu genoma possui aproximadamente 9400 nucleotídeos, contendo apenas um longo ORF (“open reading frame”) que codifica uma poliproteína viral de aproximadamente 2844 aminoácidos, que será clivada dando origem às proteínas estruturais (duas proteínas do envelope viral: E1 e E2) e às proteínas não estruturais: uma RNA helicase, uma serino protease semelhante à tripsina, e uma RNA polimerase RNA-dependente^(4,5).

Essas proteínas estruturais (E1 e E2) são muito diferentes entre o HGV/GBV-C e o HCV, pois as proteínas HGV/GBV-C possuem somente 1 e 3 sítios de glicosilação, respectivamente, comparando-se com 5 e 11 sítios para as proteínas E1 e E2 do HCV⁽⁶⁾. O reduzido número de glicosilações e a falta de uma região E2 hipervariável podem contribuir para as maiores taxas de *clearance* do HGV/GBV-C em relação ao HCV⁽⁷⁾.

Esta longa região do ORF é precedida por uma seqüência na região 5' não traduzida de 458 nucleotídeos e seguida de uma seqüência na região 3' não traduzida de 315 nucleotídeos⁽⁵⁾. Além disso, parece que a região amino-terminal

da poliproteína é truncada e sem a presença de uma região codificadora de “core”. Experimentos de traduções *in vitro* sugerem que o códon AUG imediatamente anterior à região que codifica a proteína E1 é preferencialmente utilizado para iniciar a tradução, agindo como um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES) para a iniciação da tradução da poliproteína, embora existam mais 4 códons AUGs no “frame” com a seqüência codificadora da poliproteína antes deste AUG⁽⁸⁾. Além disso, diferentes isolados do HGV/GBV-C revelaram que a freqüência de polimorfismos nas seqüências de nucleotídeos são quase igualmente distribuídas entre o primeiro, segundo e terceiro códons⁽⁹⁾. Esta distribuição imparcial sugere que esta região é inviável para conter um gene que codifique a proteína do “core”. Estas observações têm levado à especulação de que o HGV/GBV-C pode não ter a proteína do “core” ou nucleocapsídeo.

Contudo, alguns estudos utilizando perfis de sedimentação das partículas do HGV/GBV-C⁽¹⁰⁾ e, a observação da estrutura deste vírus através da microscopia eletrônica⁽¹¹⁾, demonstraram que as partículas do HGV/GBV-C são muito semelhantes às do HCV, sugerindo a presença de um nucleocapsídeo. Além disso, os indivíduos infectados pelo HGV/GBV-C produzem anticorpos que reagem com um peptídeo sintético que representa uma região altamente conservada entre os isolados deste vírus, 29 aminoácidos anteriores à região que codifica a proteína E2 (supostamente a região que codificaria uma proteína do “core”), indicando que esta proteína representativa é expressa em alguns humanos com infecção crônica pelo HGV/GBV-C⁽¹⁰⁾. Ainda assim, a origem da proteína para o nucleocapsídeo do HGV/GBV-C permanece desconhecida. A proteína potencial do “core” que codifica as regiões amino-terminal da poliproteína do HGV/GBV-C são muito menores do que aquelas do HCV, havendo uma grande possibilidade dessa região ter um peso molecular de 9.9 kDa comparado com 22 kDa para o HCV. Entretanto, sabe-se que as proteínas do “core” entre os diferentes *Flavivirus* não são tipicamente conservadas e, em média, possuem 11 kDa de tamanho.

Outra grande diferença entre o HGV/GBV-C e o HCV é o sítio de replicação viral. Sabe-se que o HCV tem sua replicação principalmente, se não exclusivamente, em hepatócitos⁽⁷⁾. Já o HGV/GBV-C foi encontrado replicando em linfócitos do sangue periférico, medula óssea e baço⁽¹²⁾. Tanto o HCV como o

HGV/GBV-C produzem uma fita negativa de RNA intermediária na célula do hospedeiro durante a replicação. Desta forma, a presença deste RNA “antisense” nas células indica uma replicação ativa^(5,12). Baseados nestas informações, vários autores realizaram estudos entre os anos de 1997 e 1999, na tentativa de esclarecer o sítio de replicação viral do HGV/GBV-C. Alguns autores conseguiram demonstrar a presença da fita negativa do RNA de HGV/GBV-C no fígado^(13,14), alguns demonstraram a presença de replicação viral em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)^(15,16,17) e ainda alguns não conseguiram demonstrar a replicação viral em ambos os sítios: fígado e PBMCs^(18,19,20,21). Até então, resultados contraditórios não haviam permitido conclusão alguma sobre esta questão.

É importante notar que, todos esses estudos realizados com o objetivo de identificar o sítio de replicação viral do HGV/GBV-C, foram conduzidos com pacientes co-infectados pelo HCV ou que tinham morrido de AIDS ou estavam em estágio final de cirrose. Eram, portanto, pacientes imunocomprometidos. Surgiu daí a necessidade de se conduzir um estudo no qual as amostras fossem obtidas de pessoas com viremia crônica, embora saudáveis. Desta forma, Tucker e colaboradores⁽²¹⁾, no ano de 2000, realizaram um estudo com quatro indivíduos saudáveis, portadores crônicos do HGV/GBV-C, que tiveram morte acidental, analisando o soro e mais 23 tecidos coletados durante o exame *pós-mortem*. Foi verificada a presença de ambas as fitas, positivas e negativas do RNA viral, no baço e na medula óssea, mas não em outros tecidos do corpo, incluindo o fígado, o que sugere que este seria um vírus linfotrópico.

Para confirmar essa teoria, ainda em 2000, um estudo conduzido por Xiang e colaboradores⁽⁸⁾, que construíram um genoma completo (full-length cDNA) de HGV/GBV-C a partir de uma amostra do plasma de um indivíduo com viremia crônica, demonstraram a replicação viral em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Para analisar o sítio de replicação, após 5 dias de infecção, extraíram o RNA das células CD4⁺ e CD4⁻ e amplificaram este material genético por meio de uma RT-PCR, verificando que a concentração relativa das fitas positivas e negativas do RNA viral eram 100 vezes maiores nas células CD4⁺ do que nas CD4⁻, indicando que 99% da replicação viral em PBMCs ocorre nas células CD4⁺. Em 2006, George e colaboradores⁽²²⁾ demonstraram através de

culturas *in vitro* a replicação do HGV/GBV-C em células CD4⁺ e CD8⁺ (linfócitos T) e CD19⁺ (linfócitos B), sugerindo que este seria um vírus panlinfotrópico.

Análises filogenéticas revelaram a existência de 5 genótipos do HGV/GBV-C. A distribuição geográfica destes genótipos está relacionada à co-evolução do vírus com os humanos durante as migrações ao longo da história, sugerindo que este seja um vírus muito antigo. Os genótipos 1 e 5 são encontrados na África. Os genótipos 2, 3 e 4 refletem as três rotas de migrações humanas da África para a Europa (genótipo 2), norte da Ásia (genótipo 3) e sul da Ásia (genótipo 4). O genótipo 3 é também encontrado na América do Sul, de acordo com os primeiros habitantes desta área, tendo chegado mais provavelmente via Estreito de Bering. O genótipo 2 é encontrado na Europa, América do Norte e, co-circulando com o genótipo 3, na América do Sul^(6,23). Contudo, estudos recentes verificaram alta prevalência dos genótipos 2 e 3 no Japão^(24,25). No Brasil, um estudo conduzido por Oliveira e colaboradores⁽²⁶⁾ verificou a presença dos genótipos 1 e 2, com predominância para o genótipo 2, numa população de doadores de sangue da cidade de Goiânia, Goiás. Outro estudo realizado em São Paulo, também identificou os mesmos genótipos, novamente com predominância do genótipo 2, presentes numa população de doadores de sangue⁽²⁷⁾.

O genoma do HGV/GBV-C apresenta baixo grau de variação nas seqüências entre os seus genótipos – cerca de 10% nos níveis de aminoácidos para a poliproteína inteira – ao contrário do HCV, que possui, por vezes, mais do que 30% de divergência.

A infecção pelo HGV/GBV-C é definida pela detecção do RNA do vírus no soro ou plasma. Essa detecção é feita pela amplificação do ácido nucléico viral utilizando métodos como “nested-PCR” ou RT-PCR qualitativo convencional e a quantificação tem sido realizada pelas técnicas de Real Time PCR e ensaio do DNA “ramificado”^(3,4,21,29,30,31,32,33). É uma infecção muito comum e a viremia pode persistir por anos sem desencadear nenhum sintoma clínico⁽²⁹⁾. Normalmente, a detecção de anticorpos contra a proteína E2 do envelope indica que o indivíduo não apresenta mais viremia, pois é muito raro (somente cerca de 1%) os indivíduos apresentarem o RNA viral e o anticorpo anti-E2 no soro ao mesmo tempo^(21,34). Entretanto, um estudo recente verificou o *clearance* da infecção, sem apresentar soroconversão para anticorpos anti-E2⁽³⁵⁾. Esses anticorpos contra a

proteína E2 do envelope são facilmente detectados através de um Ensaio Imunoenzimático - ELISA⁽³⁶⁾. Além disso, alguns estudos demonstraram que a presença de anticorpos anti-E2 protegeria o indivíduo de uma nova infecção pelo HGV/GBV-C^(37,38).

O HGV/GBV-C está distribuído mundialmente e a infecção tem sido encontrada em indivíduos saudáveis, porém com maior prevalência entre as populações com exposição a sangue ou produtos do sangue⁽³⁹⁾. Muitos relatos indicam alta prevalência de viremia (1 – 4%) nas populações saudáveis da Europa e América do Norte^(4,40). Também têm sido documentadas altas taxas de prevalência (10 – 33%) em residentes da América do Sul e África⁽²¹⁾.

Entre os indivíduos saudáveis sem exposição anterior a derivados do sangue, as taxas de prevalência de viremia pelo HGV/GBV-C variam de 0,8 a 4,2%^(4,21,41,42). Entretanto, a evidência de infecção anterior (presença de anticorpos anti-E2) nessa população é mais comum do que a viremia, podendo ultrapassar os 16%^(21,34). Aparentemente, 10 a 20% dos doadores de sangue saudáveis que são testados para outras infecções relacionadas ao sangue, têm evidência de infecção passada ou ativa pelo HGV/GBV-C.

Pacientes com exposição freqüente a sangue e seus derivados possuem alto risco de infecção pelo HGV/GBV-C, como por exemplo, entre os usuários de drogas endovenosas (IDUs), 70% apresentam anticorpos anti-E2⁽⁴³⁾. Além disso, parece que a transmissão do HGV/GBV-C é muito eficiente pela via sexual, pois foi verificado num estudo que a taxa global de infecção pelo HGV/GBV-C é semelhante entre pessoas HIV positivas que adquiriram o HIV parenteralmente e as que adquiriram pela via sexual⁽⁸⁾. As taxas de viremia parecem ser muito altas entre os indivíduos HIV positivos. Um estudo mostrou que cerca de 30 a 40% dos homens que adquiriram o HIV pela via sexual são também positivos para o HGV/GBV-C e 40% a 50% destes homens HIV positivos têm anticorpos anti-E2 detectados em seus soros⁽⁴⁴⁾. Um estudo conduzido no Japão com 297 homens homossexuais verificou uma prevalência de 12,5% para a presença do RNA viral do HGV/GBV-C⁽²⁵⁾.

No Brasil, Levi e colaboradores em 2003⁽⁴⁵⁾ investigaram a presença do HGV/GBV-C em 545 doadores de sangue de um hospital em São Paulo, e observaram uma prevalência de 9,7% do RNA viral, sendo maior entre doadores

negros e mulatos e também com menor grau de escolaridade. Outro estudo em São Paulo, conduzido pelo grupo de Ribeiro dos Santos, que aplicaram testes para a detecção do RNA de HGV/GBV-C em uma ampla amostragem (1039 amostras) da população geral, ao invés de doadores de sangue ou pacientes, encontraram prevalência de 5,1% em indivíduos maiores do que 5 anos de idade; a prevalência da infecção aumentou consideravelmente com a idade (8,3%), até os 39 anos⁽⁴⁶⁾. Um outro estudo com 241 doadores sadios do banco de sangue de Goiânia, Estado de Goiás, Brasil, verificou que 7,1% deles apresentavam RNA de HGV/GBV-C, com maior prevalência em doadores na faixa dos 29 aos 39 anos⁽²⁶⁾.

Além disso, um estudo conduzido por Lampe e colaboradores⁽⁴⁷⁾ em 1998, já havia demonstrado uma relação entre viremia pelo HGV/GBV-C ou presença de anticorpos anti-E2 com a idade, em 268 amostras de indivíduos sem doença hepática, com idades entre 0 e 80 anos. Dessa forma, descreveram soroprevalência de 2,3% entre as crianças abaixo de 10 anos de idade, chegando a um máximo de 18% entre os adultos jovens (21-30 anos) e menores taxas nos grupos de mais idade. Já a prevalência de anticorpos anti-E2 aumentou a partir de 5,6% entre os indivíduos de 18-24 anos para 35,5% nos indivíduos de 43-60 anos. Assim, acredita-se que a viremia pelo HGV/GBV-C possa persistir em indivíduos sadios durante anos antes do desenvolvimento de títulos de anticorpos anti-E2 quando finalmente ocorre o término da viremia.

O HGV/GBV-C pode ser transmitido também verticalmente, apresentando uma taxa de aproximadamente 89% em crianças entre os 03 e 09 meses de idade, cujas mães tinham infecção ativa pelo HGV/GBV-C durante a gravidez⁽⁴⁸⁾. Ainda assim, se comparado com o HCV, sua eficiência na transmissão vertical é quase 10 vezes maior⁽⁴⁹⁾.

A maioria dos indivíduos infectados pelo HGV/GBV-C desenvolve uma infecção assintomática e muitos se livram da viremia somente através dos mecanismos do próprio sistema imunológico. Entretanto, não foram essas as primeiras descobertas sobre a patogenicidade deste vírus. Logo após o vírus ser descoberto, vários trabalhos relacionavam a presença da infecção pelo HGV/GBV-C com hepatites agudas do tipo não-A-E, hepatites crônicas, hepatites fulminantes de etiologia desconhecida, e principalmente com hepatites pós-transfusionais^(4,5). No entanto, esses trabalhos investigavam sempre amostras de

pacientes que estavam acometidos por essas doenças e identificavam a presença deste vírus na maioria destes pacientes⁽⁵⁾. Da mesma forma, analisavam pacientes que tinham os níveis de ALT alterados e também verificavam a presença deste vírus na maioria dos casos⁽⁵⁾.

Entretanto, Yoshida e colaboradores⁽⁵⁰⁾, em 1995, e o grupo de Heringlake⁽⁵¹⁾, em 1996, não conseguiram demonstrar claramente em seus estudos se o HGV/GBV-C era o agente causador das hepatites de etiologia desconhecida no Japão e na Alemanha, respectivamente.

Em 1997, Alter e colaboradores^(42,43) conduziram dois estudos onde ficou claro que o HGV/GBV-C não poderia ser relacionado como agente etiológico das hepatites não-A-E. No primeiro estudo, eles utilizaram amostras de pessoas que receberam transfusão de sangue (nas quais algumas adquiriram hepatite pós-transfusional) e controles que não tinham recebido transfusão, além de consecutivos voluntários doadores de sangue. Verificaram altas prevalências entre os doadores de sangue voluntários, nos quais a viremia pelo HGV/GBV-C foi cinco vezes maior do que as taxas anteriormente relatadas para a viremia pelo HCV, para o mesmo grupo. Além disso, 73% de todas as pessoas que apresentavam viremia pelo HGV/GBV-C não apresentavam lesão hepatocelular e 16% estavam associados à mínima elevação nos níveis de ALT.

No segundo estudo, os pesquisadores selecionaram pacientes que tinham hepatite viral aguda, nos quais foi detectada a presença do RNA de HGV/GBV-C em 9% daqueles com diagnóstico de hepatite não-A-E, 20% dos pacientes com hepatite C, 25% dos pacientes com hepatite A e 32% dos pacientes com hepatite B. Verificaram ainda que as características da doença aguda eram semelhantes entre os pacientes infectados apenas pelo HGV/GBV-C e aqueles co-infectados com outros vírus ou sem a presença da infecção pelo HGV/GBV-C. Durante o acompanhamento destes pacientes durante 9 anos, não houve desenvolvimento de hepatite crônica em nenhum dos pacientes infectados somente pelo HGV/GBV-C, embora 75% deles tivessem a presença persistente do RNA viral detectável. Além disso, as taxas de hepatite crônica foram semelhantes entre pacientes somente com hepatite C (60%) e aqueles que estavam co-infectados com HGV/GBV-C (61%). Dado que a maioria das infecções pelo HGV/GBV-C não foi associada com hepatite no primeiro estudo e que a infecção persistente é

comum sem levar à doença crônica e sem afetar o curso clínico em pacientes co-infectados pelos vírus da hepatite A, B ou C, estes pesquisadores demonstraram a falta de evidência de associação do HGV/GBV-C a alguma doença hepática.

Existem vários estudos comparando a gravidade da doença clínica entre pessoas infectadas somente pelo HCV ou co-infectadas pelo HGV/GBV-C^(42,52,53,54). Não foram constatadas diferenças entre os pacientes infectados pelo HCV ou co-infectados pelo HGV/GBV-C nos níveis de ALT, grau de alteração histológica, carga viral do HCV, ou frequência de hepatite crônica^(42,55). Além disso, observou-se uma relação muito pequena entre a presença de HGV/GBV-C e os níveis de ALT em doadores de sangue, receptores de sangue, pacientes em hemodiálise, hemofílicos e usuários de drogas endovenosas⁽⁵⁶⁾.

Desta forma, não existe relação estatística entre viremia pelo HGV/GBV-C e estágio-final de doença hepática quando grupos controles apropriados são estudados⁽⁵⁷⁾. Além disso, o HGV/GBV-C não influencia as taxas ou a gravidade das hepatites pós-transplantes, nem altera as taxas de sucesso do transplante^(55,57). As altas taxas de infecção após o transplante têm mostrado estar relacionadas às transfusões necessárias durante e após a cirurgia.

Por fim, alguns outros estudos tentaram relacionar a viremia pelo HGV/GBV-C a alguma outra expressão clínica, mas também não tiveram sucesso^(58,59). Alguns estudos sugeriram que o HGV/GBV-C poderia estar associado com anemia aplástica, porém verificou-se que as altas taxas de HGV/GBV-C nestes pacientes poderiam estar relacionadas às múltiplas transfusões que são necessárias após o início da aplasia^(23,60). Raramente os pacientes são testados antes das transfusões. Além disso, vários estudos falharam ao demonstrar alguma associação entre a infecção pelo HGV/GBV-C e o carcinoma hepatocelular^(23,35,61), linfoma não-Hodgkin^(56,62), porfíria cutânea tardia⁽⁶³⁾ e carcinoma oral⁽⁶⁴⁾.

Como a maioria dos dados sobre as infecções pelo HGV/GBV-C não fornecem evidência de que o vírus possa ser o agente causador de hepatite aguda ou crônica de etiologia desconhecida, e estudos controlados não têm demonstrado nenhuma associação entre o HGV/GBV-C e alguma patologia^(23,27,35,41,42,59,60,61,62,65), o FDA (Food and Drug Administration, dos EUA) decidiu não continuar triando o RNA de HGV/GBV-C ou anticorpos contra a proteína E2

no sangue de doadores nos Estados Unidos. Esta é uma atitude importante, uma vez que existem aproximadamente 11.500.000 unidades de produtos de sangue doados anualmente nos Estados Unidos. Dado que a prevalência deste vírus em doadores de sangue sadios desta região chega a 1,8%, estima-se que 566 unidades doadas diariamente contenham RNA de HGV/GBV-C ⁽⁴⁶⁾.

Uma vez que compartilham os mesmos modos de transmissão, a co-infecção HGV/GBV-C – HIV também é muito freqüente. Entre pacientes HIV positivos, homossexuais e do sexo masculino as taxas de prevalência de infecção pelo HGV/GBV-C é de 37% ⁽⁶⁶⁾. Outro estudo aponta 30% de viremia pelo HGV/GBV-C, além de outros 20% para a presença de anticorpos anti-E2 entre 346 pacientes HIV-positivos, sendo as maiores prevalências descritas entre usuários de drogas e homossexuais masculinos ⁽⁶⁷⁾.

Nos casos de co-infecção HGV/GBV-C e HIV, vários estudos apontam que a viremia pelo HGV/GBV-C está associada a uma baixa taxa de mortalidade entre os pacientes infectados pelo HIV-1, progressão lenta para a AIDS e maior sobrevida após o desenvolvimento da AIDS. Em alguns estudos há, inclusive, uma associação entre a co-infecção pelo HGV/GBV-C e aumento das células T CD4⁺.

Toyoda e colaboradores ⁽⁶²⁾ foram os primeiros a publicar um estudo sobre o impacto da co-infecção pelo HGV/GBV-C em pacientes HIV-positivos. O estudo incluiu 41 pacientes hemofílicos, portadores do vírus HIV. A viremia pelo HGV/GBV-C foi detectada em 11 dos 41 pacientes (26,8%). Verificou-se que as médias das cargas virais do HIV eram menores nos pacientes co-infectados pelo HGV/GBV-C do que naqueles que não apresentavam a viremia por esse agente. Não houve significância estatística referente à evolução para o diagnóstico de AIDS e risco de morte.

No mesmo ano (1998), um outro grupo liderado por Heringlake ⁽⁶³⁾ estudou 197 pacientes HIV-positivos, dentre os quais 33 (16,8%) eram positivos para RNA de HGV/GBV-C, e outros 112 eram positivos para anticorpos anti-E2. Pacientes com viremia pelo HGV/GBV-C tinham maior contagem de células T CD4⁺ e progrediam menos freqüentemente para AIDS do que os pacientes com exposição anterior (anti-E2 positivos) ou sem exposição. Análises de Kaplan-

Meier indicaram significante melhora na sobrevida após o primeiro teste para HIV positivo nos pacientes que tinham viremia pelo HGV/GBV-C.

Entretanto, o grupo de Sabin⁽⁶⁴⁾ no mesmo ano, não conseguiu demonstrar a melhora na sobrevida e nenhum outro efeito presente em 94 pacientes ingleses, hemofílicos e HIV-positivos. Contudo, nesse estudo, não houve separação entre o grupo de pacientes positivos para RNA de HGV/GBV-C e pacientes positivos para anticorpos anti-E2. Ambos foram classificados como sendo pacientes expostos ao HGV/GBV-C.

No ano seguinte (1999), Lefrere e colaboradores⁽⁶⁸⁾ estudaram 95 franceses infectados pelo HIV, dentre os quais 23 tinham viremia para o HGV/GBV-C. Analisando os dados, os pacientes que apresentavam viremia pelo HGV/GBV-C apresentaram maior sobrevida e parâmetros clínico-laboratoriais melhores, incluindo carga viral, contagem de células T CD4⁺ e taxas de progressão para doença (AIDS). Após 5 anos, a média da carga viral para o HIV e a contagem de células T CD4⁺ eram ainda significativamente mais favoráveis para o grupo que apresentava a viremia pelo HGV/GBV-C.

Em 2000, Yeo e colaboradores⁽⁵⁹⁾ conduziram um estudo com 131 pacientes com hemofilia que se tornaram HIV-positivos entre 1978 e 1985. Verificaram que os pacientes que apresentavam RNA do HGV/GBV-C e aqueles que apresentavam anticorpos anti-E2 tinham maior contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺. O risco para AIDS foi aproximadamente 40% menor nos pacientes HGV/GBV-C positivos do que para os indivíduos negativos. A presença de co-infecção com o HCV não teve impacto significativo sobre o risco de AIDS, assim como a presença da deleção no gene CCR5 ($\Delta 32$).

Em 2001, os 197 pacientes estudados por Heringlake⁽⁶³⁾ foram acompanhados por Tillmann e colaboradores⁽⁶⁹⁾ que conduziram um outro estudo onde avaliaram, além da relação entre a infecção pelo HGV/GBV-C e a progressão da doença pelo HIV, também a correlação entre a carga viral de HGV/GBV-C e a contagem de células T CD4⁺ e/ou a carga viral para o HIV. Entre os pacientes positivos para RNA de HGV/GBV-C, a sobrevida foi significativamente maior e houve uma lenta progressão para a doença (AIDS) se comparado com o grupo sem viremia para HGV/GBV-C, mesmo após o início da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART). A sobrevida após o

desenvolvimento da AIDS também foi melhor entre os pacientes HGV/GBV-C positivos. Além disso, a carga viral do HIV foi menor entre os pacientes infectados pelo HGV/GBV-C, e não houve correlação com a contagem de células T CD4⁺.

Ainda no mesmo ano, um outro grupo liderado por Xiang⁽⁷⁰⁾ conduziu um estudo com 362 pacientes HIV-positivos, dos quais 144 tinham a presença do RNA de HGV/GBV-C. Quarenta e um dos pacientes que apresentavam viremia pelo HGV/GBV-C morreram durante o período de acompanhamento, contrapondo-se a 123 dos 218 pacientes que eram HGV/GBV-C negativos. Desta forma, a taxa de mortalidade foi significativamente menor entre os pacientes com viremia pelo HGV/GBV-C, em relação aos que não apresentavam a viremia. No entanto, a viremia pelo HGV/GBV-C não preveniu a depleção das células T CD4⁺. Além disso, para determinar se a infecção pelo HGV/GBV-C poderia alterar a replicação do HIV *in vitro*, culturas de PBMCs foram infectadas pelo HIV e pelo HGV/GBV-C. A replicação do HIV foi demonstrada pela produção do antígeno p24 no sobrenadante das culturas, que foi inibido em 23% após 3 dias em cultura e 46,4% após 6 dias de cultura quando o HGV/GBV-C e o HIV foram usados para infectar as células simultaneamente. Ao infectar as células com o HIV 24 horas antes da infecção pelo HGV/GBV-C, observaram resultados semelhantes ao anterior, mas ao infectar as células com HGV/GBV-C 24 horas antes da infecção pelo HIV, observou-se profunda inibição da replicação, reduzida em 87,4% após 3 dias da infecção e chegando a 99% de redução após 6 dias.

Este aparente efeito benéfico na co-infecção pelo HGV/GBV-C em pacientes infectados pelo HIV também foi demonstrado em pacientes que estavam em tratamento com drogas antiretrovirais, indicando uma melhor resposta destes pacientes ao tratamento^(71,72,73,74).

Para saber se a inibição poderia estar relacionada aos diferentes genótipos do HGV/GBV-C, Muerhoff e colaboradores⁽⁶¹⁾ em 2003, examinaram a presença de diferentes genótipos de HGV/GBV-C numa coorte de pacientes co-infectados. Entre 35 pacientes testados, o genótipo foi determinado para 33: dois pacientes eram infectados pelo genótipo 1, 12 com o subtipo 2a e 19 com o subtipo 2b. Verificou-se que a contagem de células T CD4⁺ tendeu a ser menor em pacientes infectados com o genótipo 2a, comparado com aqueles com genótipo 2b,

sugerindo que a melhora na sobrevida pode estar relacionada também ao genótipo específico.

Outro estudo conduzido recentemente demonstrou efeito benéfico nos pacientes infectados pelo HIV e co-infectados pelo HGV/GBV-C, mas não conseguiu distinguir diferenças entre os genótipos 2 e 3, encontrados na região⁽²⁴⁾.

Além disso, os níveis de expressão do co-receptor CCR5 parece ser um fator importante na transmissão e progressão da doença pelo HIV. Foi observado que as glicoproteínas do envelope do HGV/GBV-C, especificamente E2, se ligam ao CD81 em linfócitos T. Esta interação induz a liberação, de forma dose-dependente, da quimiocina RANTES, um ligante natural do CCR5, induzindo a internalização deste co-receptor e causando um bloqueio celular para a entrada do HIV nas células^(75,76,77).

Em 2005, Xiang e colaboradores⁽⁷⁸⁾ coletaram amostras de doadores sadios de Durban, África do Sul, e num trabalho de co-infecção *in vitro* HGV/GBV-C de genótipos 1 e 5 e HIV sugeriram que a inibição causada pelo HGV/GBV-C na replicação do HIV possa estar relacionada aos altos níveis de quimiocinas RANTES, (que é ligante natural do receptor CCR5) e SDF-1 (que é ligante natural do receptor CXCR4) detectadas nessas culturas.

Além disso, o mesmo grupo em 2007 verificou que a expressão da proteína NS5A do HGV/GBV-C pode inibir a replicação de cepas X4 do HIV *in vitro*, devido à maior liberação da quimiocina SDF-1 e baixa expressão do co-receptor CXCR4 nos linfócitos, dificultando também a entrada do HIV nessas células⁽⁷⁹⁾. Entretanto, mais estudos nessa área são necessários para esclarecer melhor este mecanismo.

Alguns pesquisadores, analisando o perfil imunológico para tentar entender a interação viral entre o HGV/GBV-C e o HIV-1 em outros estudos, observaram que os níveis no soro de interleucina-2 (IL-2), IL-12, IL-4 e IL-10 permaneceram relativamente estáveis no grupo que era positivo para RNA de HGV/GBV-C, enquanto o grupo negativo teve um declínio para IL-2 e IL-12 de aproximadamente 85 e 83%, respectivamente, ao lado de aumento de IL-4 e IL-10, preservando uma resposta do tipo Th1^(75,80).

Embora vários estudos apontem para um efeito benéfico na progressão da doença entre pacientes co-infectados pelo HGV/GBV-C e HIV, em 2002 dois estudos não conseguiram demonstrar melhora na sobrevida ou situação clínica benéfica nesses pacientes^(81,82). Outros estudos publicados posteriormente também não demonstraram nenhum efeito benéfico na co-infecção do HGV/GBV-C em pacientes HIV positivos^(83,84).

Em um estudo realizado em 2005, na tentativa de esclarecer o efeito que a co-infecção pelo HGV/GBV-C tem na progressão da doença causada pelo HIV-1, Van der Bij e colaboradores⁽³⁵⁾ avaliaram 326 homens homossexuais, positivos para HIV-1 e que foram testados quanto à presença de RNA de HGV/GBV-C e anticorpos anti-E2 em várias amostras durante o acompanhamento da infecção pelo HIV-1. Não se verificou evidências de que o RNA de HGV/GBV-C ou anticorpos anti-E2 tivessem um efeito protetor em relação à progressão da doença. Contudo, quando se compararam os pacientes que apresentavam ausência contínua para RNA de HGV/GBV-C, com aqueles que perderam a viremia pelo HGV/GBV-C, principalmente quando ocorreu sem evidências de produção de anticorpos anti-E2, houve maior progressão da doença. Ao contrário dos estudos anteriores, a perda da viremia não estava necessariamente associada com a persistência de anticorpos anti-E2, enquanto a soroconversão para E2 não necessariamente resultou no clareamento da viremia. Esses autores sugerem que a perda da viremia pelo HGV/GBV-C está associada à perda de células T CD4⁺, que é o sítio de replicação primária deste vírus.

Da mesma forma, um trabalho apresentado na *Thirteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections* por Björkmann e colaboradores em 2006, no qual analisaram uma coorte de 28 pacientes, relatou que a carga viral do HGV/GBV-C aumenta quando os pacientes co-infectados pelo HIV iniciam o tratamento antiretroviral, no qual se inibe significativamente a replicação do HIV, sugerindo que os altos níveis de HGV/GBV-C são uma consequência, e não a causa dos baixos níveis de carga viral do HIV.

Em resumo, o HGV/GBV-C não previne a entrada do HIV nas células, mas tem um efeito inibitório na replicação do HIV em cultura celular. Este efeito não parece ser resultado da toxicidade celular, considerando que a replicação do HGV/GBV-C em PBMCs pareceu não ser citopática e não inibir a síntese de

proteínas celulares. O fato é que o HGV/GBV-C e o HIV podem infectar e replicar em PBMCs, sugerindo que estes dois vírus interagem direta ou indiretamente durante todo o ciclo celular.

Visto que a viremia pelo HGV/GBV-C é muito comum, aparentemente não está relacionada a nenhuma expressão clínica e que estudos conduzidos com pacientes co-infectados pelo vírus HIV-1 demonstraram melhora na sobrevivência desses pacientes, mais estudos nessa área ainda são necessários, pois a identificação dos mecanismos pelos quais ocorre essa interferência viral pode levar ao desenvolvimento de novas possibilidades de tratamento aos pacientes infectados pelo HIV.

No Brasil, ainda não foram realizados trabalhos de quantificação da carga viral do HGV/GBV-C, de forma que o desenvolvimento de uma técnica molecular para esse fim poderia ser útil como uma ferramenta a mais nas investigações futuras para ajudar a esclarecer algumas perguntas que ainda se encontram sem respostas.

1.2 Reação da PCR em Tempo Real (Real Time PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) que permitiu a quantificação das amostras amplificadas foi primeiramente proposta por Higuchi e colaboradores⁽⁸⁵⁾ em 1992/93, no qual usavam o brometo de etídio, reagente que age como um intercalante de fita dupla de DNA em cada ciclo de amplificação, com um termociclador adaptado para irradiar as amostras através da luz ultravioleta, onde a fluorescência era captada por uma câmera CCD. A amplificação produzia um aumento na quantidade de DNA de dupla fita, no qual o brometo de etídio se ligava, resultando num aumento da fluorescência captada. Teoricamente, existe uma relação entre a quantidade de seqüências alvo iniciais e a quantidade de produto de PCR produzido na fase exponencial da reação⁽⁸⁶⁾. Este sistema era capaz de determinar a quantidade de alvo inicial de uma amostra durante a PCR, como um indicador de produção de produto da PCR em cada ciclo da reação, ao contrário do observado no sistema de end-point.

Este sistema de quantificação foi aperfeiçoado com a substituição do brometo de etídeo pelo SYBR Green I como intercalante, que possui afinidade

100 vezes maior ao DNA de fita dupla, onde sua captação de fluorescência é realizada por meio de filtros adequados e os resultados fornecidos em um software.

Ainda assim, poder-se-ia dizer que essa quantificação era relativa, uma vez que o intercalante poderia se ligar a alvos não específicos de dupla fita e emitir uma fluorescência inespecífica. Atualmente em ensaios que utilizam intercalantes é aplicado um ciclo final denominado *melting curve* para separar os produtos específicos dos inespecíficos.

Desse modo, o desenvolvimento de *probes* marcadas garantiu a emissão de fluorescência somente quando o alvo específico estivesse sendo amplificado. Holland e colaboradores⁽⁸⁷⁾ foram os primeiros a demonstrar que a clivagem de uma *probe* alvo durante a PCR pela atividade 5' nuclease da Taq DNA polimerase poderia ser utilizada para detectar a amplificação de um alvo específico. Além dos componentes usados para uma PCR convencional, a *probe* continha a seqüência complementar à região alvo e era marcada com ³²P na sua extremidade 5' e bloqueada na extremidade 3' para que não funcionasse como um *primer*. Durante a amplificação, o anelamento da *probe* na seqüência alvo gerava um substrato que era clivado pela atividade 5' nuclease da Taq DNA polimerase quando a enzima estava estendendo a fita a partir do *primer* sense. Este sistema garantia que a clivagem da *probe* só ocorresse quando a seqüência alvo estivesse sendo amplificada. Esta técnica analisava os resultados com base na clivagem da *probe*, usando uma cromatografia de camada para separar os fragmentos clivados da *probe* intacta.

O desenvolvimento de *probes* fluorogênicas por Lee e colaboradores⁽⁸⁸⁾ em 1993 tornou possível eliminar o processamento dos resultados pós-PCR pelas análises de degradação de *probe*, como também a utilização de substâncias radioativas. A *probe* é um oligonucleotídeo marcado com uma fluorescência *repórter* na porção 5' e um *quencher* (inibidor) na porção 3'. Enquanto a *probe* está intacta, a proximidade do *quencher* reduz a emissão da fluorescência *repórter*, pois quando irradiada, a molécula *repórter* transfere energia à molécula *quencher* próxima por meio de um mecanismo chamado FRET (Föster Resonance Energy Transfer). A *probe* é desenhada para anelar entre um par de *primers*. A clivagem da *probe* pela atividade 5' nuclease da Taq DNA polimerase

separa o *repórter* do *quencher*, aumentando a emissão do sinal *repórter*. Esta clivagem remove a *probe* da fita alvo, permitindo que a extensão da fita continue até o final. Desta forma, a inclusão da *probe* não inibe o processo de amplificação da PCR. Este sinal emitido aumenta na proporção direta da quantidade de produto amplificado na reação. Por registrar a quantidade de emissão de fluorescência em cada ciclo, é possível monitorar a PCR na fase exponencial onde o primeiro aumento significativo na quantidade de produto de PCR correlaciona à quantidade inicial de seqüências alvo. Quanto maior o número de cópias da seqüência alvo no início da reação, mais cedo um aumento significativo na fluorescência é observado ⁽⁸⁸⁾.

Nos ciclos iniciais da PCR em Tempo Real há pouca variação no sinal de fluorescência, definindo o *baseline* para o gráfico de amplificação. Quando a reação entra na fase exponencial, ocorre um aumento da fluorescência acima deste basal, indicando o acúmulo do produto amplificado. Uma linha de base pode ser fixada, denominada “threshold”. O Ct (cycle threshold) é definido como o momento em que a fluorescência ultrapassa esta linha. Podemos determinar o número de cópias iniciais quando o valor do Ct, representativo da quantificação de amostras desconhecidas, é colocado frente a valores de uma curva padrão de quantificações conhecidas.

A vantagem das *probes* fluorogênicas sobre os intercalantes de fitas duplas de DNA é que a hibridização específica entre *probe* e o alvo é necessária para gerar o sinal de fluorescência. Desta forma, com as *probes* fluorogênicas, amplificações não específicas devido a anelamentos errados ou *primer-dimer* não geram sinal. Outra vantagem é que as *probes* podem ser marcadas com diferentes fluorescências *repórter*, permitindo a amplificação de dois ou mais alvos distintos numa mesma PCR, o que chamamos de PCR multiplex ⁽⁸⁹⁾.

A PCR em Tempo Real é uma técnica de alta precisão, reprodutibilidade e sensibilidade, que pode ser aplicada em várias áreas da Biologia e Medicina. Sua utilização minimiza o risco de contaminação por meio de *amplicons*, pois não é necessária a manipulação pós-PCR, além de podermos analisar um grande número de amostras em pouco tempo.

Além disso, é uma técnica de fácil execução, com resultados rápidos e confiáveis, muito explorada no diagnóstico clínico e monitoramento de doenças

infecciosas, bem como na utilização para determinação da carga viral de agentes infecciosos, representando uma importante técnica molecular para o diagnóstico laboratorial.

2. Objetivos

2. Objetivos

- Desenvolvimento de técnica de PCR em Tempo Real para a detecção e a quantificação da carga viral do HGV/GBV-C em plasma.
- Aplicação desta metodologia em pacientes HIV-soropositivos atendidos no ambulatório do CCDI (Centro de Controle de Deficiências Imunológicas) do Hospital São Paulo.
- Comparação dos pacientes infectados pelo HIV com os pacientes co-infectados pelo HGV/GBV-C em termos de cargas virais para o HIV e contagem de células T CD4⁺.
- Análise de uma possível correlação entre as cargas virais do HIV e do HGV/GBV-C.

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Amostras

As amostras de plasma foram coletadas de pacientes atendidos no ambulatório do CCDI (Centro de Controle de Deficiências Imunológicas) do Hospital São Paulo para acompanhamento e tratamento de infecção pelo HIV-1 durante o período de abril/2006 a abril/2007.

Para a coleta, os pacientes obedeceram aos seguintes critérios de inclusão:

- Idade entre 18 e 70 anos;
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

Não foram incluídos no protocolo os pacientes que:

- Apresentaram doença e sintomas clínicos que, no entendimento do investigador, pudessem comprometer a participação no protocolo;
- Apresentaram doença psiquiátrica, cognitivo-motora ou uso de drogas/álcool que, no entendimento do investigador, pudessem comprometer o entendimento do termo de consentimento ou induzir alterações alheias à infecção pelos vírus HGV/GBV-C e HCV;
- Pacientes de possuíam marcador para a infecção pelo vírus da Hepatite B (AgHBs);

Os pacientes incluídos no estudo foram informados quanto aos objetivos do mesmo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição (vide ANEXO 2).

Para cada paciente incluído no estudo, foram coletadas amostras de sangue em 4 tubos de 5mL cada com EDTA, que foram utilizados para a quantificação de linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺, carga viral do HIV, pesquisa do anticorpo anti-E2 e carga viral do HGV/GBV-C. As amostras de sangue destinadas à quantificação dos linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e carga viral do HIV foram encaminhadas aos respectivos laboratórios do complexo UNIFESP-EPM que realizam estes testes.

Os tubos destinados à pesquisa de anticorpo anti-E2 e carga viral do HGV/GBV-C foram centrifugados por 10 minutos a 2.500 rpm para provocar a separação das hemácias e do plasma. A seguir, o plasma foi aliqotado em microtubos de 1,5mL contendo volume de 500µL cada e armazenado em freezer a -80°C até a realização dos testes.

3.2 Reagentes e equipamentos

Os equipamentos e reagentes utilizados para a realização de todas as etapas deste estudo estão listados nas tabelas abaixo:

Tabela 1. Reagentes utilizados na realização do trabalho

REAGENTE	MARCA	NÚMERO DE CATÁLOGO
Acetona Absoluta PA	Merck	--
Agarose	Invitrogen	15510019
Blue Juice	Invitrogen	10816015
Brometo de etídeo	BioAgency	161-0433N
DuraScribe T7 Transcription kit	Epicentre Biotechnologies	--
Etanol Absoluto PA	Merck	--
Glicerol	Merck	Glicerol
Meio de cultura Immedia Amp Blue	Invitrogen	Q602-20
Meio de cultura Immedia Amp Liquid	Invitrogen	Q600-20
Meio TSB	Oxoid	--
MSC I	New England BioLabs	--
Padrão de Peso Molecular 100bp	Invitrogen	15628019
Platinum Taq DNA Polimerase	Invitrogen	10966030
QIAfilter Plasmid Midi Kit (25)	Qiagen	12243
QIAquick PCR Purification Kit (50)	Qiagen	28104
Random Primers	Invitrogen	48190011
RNase Out	Invitrogen	10777019

Ribomax Large Scale RNA Production Systems – T7	Dialab	P1300
SLAX-R kit de extração RNA/DNA	Centro de Genomas	CPKE10
S.O.C Medium	Invitrogen	15544034
SuperScript III	Invitrogen	18080044
SuperScript III Platinum – One-Step qRT-PCR System	Invitrogen	11732020
Sybr Gold	Invitrogen	S11494
Tampão TBE 10x	Invitrogen	15581044
TOPO TA Cloning Version Q	Invitrogen	K4520-01
100mM dNTP set	Invitrogen	10297018

Continuação da tabela 1. Reagentes utilizados na realização do trabalho.

Tabela 2. Equipamentos utilizados na realização do trabalho

EQUIPAMENTO	MARCA
Agitador – Incubadora Refrigerada com agitação TE422	TECNAL
Centrífuga 5810R	Eppendorf
Eletroporador Micropulser	Bio-Rad
Espectrofotômetro BioMate 5	ThermoSpectronic
Microcentrífuga 5415R	Eppendorf
Termobloco Standart Heatblock	VWR Scientific
Termociclador 9700	Applied Biosystems
Aparelho de quantificação em Tempo Real iCycler®	Bio-Rad
ND 1000	Nano Drop

3.3 Estudo da região genômica para o desenho dos *primers*

A região do genoma viral do HGV/GBV-C escolhida para a padronização da PCR em Tempo Real foi a 5' UTR. Esta região genômica foi escolhida por ser referida na literatura como uma porção conservada entre todos os isolados de HGV/GBV-C ⁽⁹⁰⁾.

Desta forma, foram obtidas seqüências genômicas da região 5' UTR depositadas no GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) que foram alinhadas no software Sequencher, versão 4.5 – Gene Codes Corporation. No total, foram alinhadas 119 seqüências de vários países, embora preferencialmente sul-americanas, incluindo as seqüências brasileiras encontradas. Além destas seqüências, foram alinhadas também seqüências do genoma completo (no total de 7) juntamente com as seqüências da região 5' UTR.

Foram utilizados como base para o estudo das seqüências genômicas dois trabalhos que utilizaram a técnica da PCR em Tempo Real^(31,32) e ficou estabelecida a utilização da seqüência U44402 de genoma completo, submetida por Linnen e colaboradores ⁽⁵⁾, como parâmetro para o desenho dos *primers*.

Por fim, os *primers* foram analisados no Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para averiguar se não havia similaridade com nenhuma seqüência genômica de outro microrganismo, principalmente ao vírus da Hepatite C, que pertence à mesma família do HGV/GBV-C, compartilhando com ele cerca de 30% de homologia na seqüência genômica.

3.4 Padronização da PCR qualitativa

Para esta etapa do estudo, utilizamos uma amostra de material conhecidamente positivo para HGV/GBV-C (bolsa de plasma, doada gentilmente pelo Profº Dr. José Eduardo Levi, Instituto de Medicina Tropical, USP; Bolsa de plasma de paciente do banco de sangue do Hospital Sírio Libanês com demais testes sorológicos para doação de sangue negativos).

A padronização da PCR qualitativa foi necessária para a amplificação de uma região genômica do HGV/GBV-C e sua posterior utilização para clonagem e obtenção de um plasmídeo recombinante. Este foi necessário para a construção de uma curva de quantificação absoluta para o sistema da PCR em Tempo Real.

Desta forma, foram escolhidos *primers* de um trabalho publicado por Muerhoff e colaboradores ⁽⁹⁰⁾, uma vez que esses *primers* amplificam uma porção da região 5'UTR de 452 pares de bases, que abrange a porção onde foram desenhados os *primers* para a reação da PCR em Tempo Real (87 pares de bases). Esses *primers* estão localizados nas seguintes posições e possuem as seguintes seqüências:

Sense: -520 à -499 (21 oligonucleotídeos) 5' CAC TGG GTG CAA GCC CCA GAA 3'

Antisense: -89 à -68 (21 oligonucleotídeos) 5' CGG AGC TGG GTG GCC CCA TGC 3'

3.4.1 Extração de RNA da Amostra

A bolsa de plasma positiva para HGV/GBV-C foi alíquotada em volumes de 500µL/tubo e armazenada em freezer a -80°C até a sua utilização para a realização dos testes.

Para a extração do RNA foi utilizado um kit de extração em sílica líquida (SLAX-R kit de extração RNA/DNA – Centro de Genomas; uso somente para pesquisa) segundo técnica de Boom e colaboradores ⁽⁹¹⁾. A amostra de plasma foi descongelada à temperatura ambiente, homogeneizada, e 200µL foram pipetados em um microtubo (1,5mL) que continha 500µL do tampão de amostra (kit). Após homogeneizar, foi acrescentado ao tubo 50µL de sílica líquida onde foi homogeneizado novamente. O produto foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente, para que ocorresse a ligação do material genômico à sílica. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 30 segundos à 10.000 rpm, o sobrenadante descartado e sucessivas lavagens foram realizadas (duas vezes com tampão de amostra, duas vezes com Etanol 70% - e uma vez com Acetona PA), conforme instrução do fabricante. Após a última lavagem a sílica foi colocada para secar em um termobloco por 10 minutos à 55°C, com o tubo aberto. Em seguida, adicionaram-se 50µL do tampão de eluição (Tris-EDTA 10/1mM), e o material foi incubado por 10 minutos à 55°C no termobloco, para ocorrer a eluição do RNA. Então o tubo foi centrifugado à 13.000 rpm por 2 minutos e o material utilizado para a realização da transcrição reversa.

3.4.2 Reação de Transcrição Reversa

A reação de transcrição reversa para obtenção de cDNA, foi realizada utilizando enzima SuperScript III (Invitrogen), conforme procedimento operacional padrão do laboratório. Brevemente, a reação de transcrição reversa foi realizada com o preparo de duas soluções diferentes, sendo que na primeira foram adicionados em suas concentrações finais: *primers* randômicos(150 ng), DNTP mix (1,25mM) e água milliQ. Nessa solução foram adicionados 5µL do RNA extraído e incubados por 5 minutos à 65°C no termobloco. Em seguida os tubos foram colocados no gelo por 1 minuto. Adicionou-se, então, a segunda solução, preparada com tampão (aproximadamente 3 vezes concentrado), DTT (0,0002 M), RNase Out (40 U) e a enzima SuperScript III (200 U). Os tubos foram então incubados a 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos;

3.4.3 Reação da PCR

A PCR qualitativa utilizando os *primers* publicados por Muerhoff foi padronizada em duplicatas.

Brevemente, a PCR padronizada inclui os seguintes reagentes em suas concentrações finais: Tampão (concentrado 1 vez), MgCl₂ (2,5 mM), DNTP mix (0,2 mM), *primer* sense (0,5 µM), *primer* antisense (0,5 µM) e Taq Platinum (1,25U). A ciclagem foi efetuada em termociclador 9700 (Applied Biosystems) em um ciclo de 94°C por 7 minutos, 35 ciclos de (94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos) e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

Após a PCR, foi realizada eletroforese do material em gel de agarose 1,5% em TBE 1X e a visualização das bandas correspondentes foi feita por meio de brometo de etídeo 0,05mg/mL (BioAgency) em transluminador para análise do produto amplificado que foi comparado ao marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen). O material foi fotografado por Polaroid (Model 545i 4X5 – Film Holder).

3.5 Clonagem molecular e transformação bacteriana

3.5.1 Produção de bactérias eletrocompetentes

Uma colônia bacteriana da cepa DH10B foi gentilmente doada pelo laboratório ALERTA – DIPA e colocada em 100mL de caldo TSB (Oxoid) em agitador (Incubadora Refrigerada com agitação TE 422 – TECNAL) com agitação de 200 rpm, durante aproximadamente 3 horas à 37°C.

Quando o crescimento atingiu uma absorbância de 0,6 medida por espectrofotômetro (BioMate 5 – Thermo Spectronic) a 600 nm, indicando fase exponencial de crescimento bacteriano, os tubos foram centrifugados a 6000 rpm por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 40mL de água MilliQ estéril à 4°C para a lavagem do *pellet* bacteriano. Foram realizadas mais duas lavagens, sendo que na última o *pellet* foi ressuspensionado em 5mL de água MilliQ e este volume distribuído igualmente (aproximadamente 1mL) em cinco microtubos e centrifugados novamente a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido, o volume bacteriano estimado e acrescentado ao tubo 80µL de glicerol 10% (Merck), sendo homogeneizado gentilmente com a pipeta.

Foram distribuídos 40µL deste homogeneizado em microtubos de 0,2mL e levados ao nitrogênio líquido para congelamento rápido por 5 a 7 segundos. Imediatamente os tubos foram armazenados em freezer a -80°C até a sua utilização.

3.5.2 Obtenção de plasmídeo recombinante

O produto da PCR descrita no item 3.4.3 foi purificado utilizando um kit comercial (QIAquick PCR Purification Kit (50) - Qiagen), conforme instruções do fabricante. Foi então realizada uma reação de clonagem utilizando o Kit TOPO TA Cloning Version Q – Invitrogen, onde 2µL do produto purificado da PCR foram incubados com 1µL de solução salina, 2µL de água MilliQ e 1µL do vetor TOPO por 5 minutos à temperatura ambiente.

Imediatamente após a incubação, 2µL do produto resultante foram acrescentados ao *vial* de bactérias eletrocompetentes descongelado no gelo e todo o material transferido para a cubeta própria de eletroporador. A cubeta foi

posicionada corretamente ao eletroporador (Micropulser – BioRad), para que houvesse a passagem da corrente elétrica e, após a descarga, foram adicionados imediatamente 500µL de Meio SOC (Invitrogen) à cubeta, e incubado à 37°C em estufa por 30 minutos.

Após a incubação, aproximadamente 180µL foram plaqueados em 3 placas de Petri com meio LB sólido previamente preparado (ImMedia Amp Blue – Invitrogen – preparado conforme instruções do fabricante). As placas foram incubadas à 37°C em estufa por aproximadamente 20 horas, para que fosse possível a observação do crescimento de colônias brancas e azuis. Algumas colônias brancas foram selecionadas e transferidas (cada uma) para 20mL de caldo nutritivo de crescimento (ImMedia Amp Liquid – Invitrogen – preparado conforme instrução do fabricante) em tubos tipo Falcom de 50mL, que foram incubados à 37°C com agitação de 200 rpm por aproximadamente 20 horas.

Observando-se o crescimento bacteriano através da turbidez do meio de cultura, uma alíquota de 1 mL de cada tubo foi armazenada para posterior análise da clonagem. Então, os tubos de crescimento foram centrifugados a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado, o *pellet* ressuscitado e armazenado em freezer a -20°C até que a análise da eficiência da clonagem fosse realizada.

Para a análise da eficiência da clonagem e transformação, os microtubos contendo 1mL do caldo de crescimento foram centrifugados à 6000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuscitado em 100µL de água MilliQ, que foi incubado à 100°C por 10 minutos em termobloco, para que ocorresse a lise bacteriana e liberação do plasmídeo. Assim, 3µL desta solução foram utilizados numa PCR conforme protocolo do item 3.4.3 para verificação do inserto no plasmídeo e eficiência da transformação bacteriana.

Uma vez comprovada a presença do inserto no plasmídeo, foi realizada a purificação do plasmídeo dos tubos armazenados em freezer -20°C com kit comercial (QIAfilter Plasmid Midi Kit (25) - Qiagen), conforme instruções do fabricante.

Esse produto purificado foi, então, quantificado em um espectrofotômetro (N 1000 - Nano Drop).

3.5.3 Verificação da orientação do inserto

Sendo o HGV/GBV-C um vírus RNA, houve necessidade de transformação do material obtido por meio da clonagem e transformação bacteriana (cDNA) em RNA. Para isso, foi necessária a linearização do plasmídeo recombinante e subsequente realização de uma transcrição *in vitro* para a obtenção de um RNA sintético que pudesse ser quantificado para a construção de uma curva de quantificação absoluta para o sistema da PCR em Tempo Real.

Ainda assim, antes desses procedimentos foi necessária a verificação da orientação do inserto, uma vez que este deveria estar em orientação positiva em relação ao promotor T7 que se encontra no vetor TOPO TA, utilizado na clonagem, para que a transcrição *in vitro* fosse eficiente.

Para o teste de verificação da orientação dos insertos, foram realizadas duas PCRs, utilizando o mesmo protocolo descrito no item 3.4.3, onde a uma delas adicionou-se *primer* sense utilizado na clonagem (Muerhoff sense) e *primer* antisense M13 (obtido junto ao kit TOPO TA cloning – Invitrogen) e, na outra reação, adicionou-se *primer* antisense utilizado na clonagem (Muerhoff antisense) e *primer* antisense M13. A orientação correta seria aquela onde houvesse amplificação do material cujos *primers* adicionados fossem sense utilizado na clonagem e antisense M13.

Posteriormente, para a confirmação do resultado anterior em relação à orientação dos insertos, foram seqüenciados dois clones (C3 e C9).

A reação de sequenciamento foi feita em placa de 96 alvéolos para leitura no sequenciador da Applied Biosystems 3100 e utilizado o Kit ABI Prism Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing.

Foi preparada uma solução contendo 2µL do reagente “Big Dye” contendo os dideoxinucleotídeos marcados, 4µL do tampão 5X e 3 µL do *primer* a 2pM de concentração. Esta solução foi realizada para cada *primer* (M13 sense e M13 antisense), multiplicada pelo número de amostras a serem analisadas e distribuíram-se 9 µL por alvéolo na placa. Uma outra solução foi preparada contendo a amostra e a água MilliQ qsp para um volume final de 6µL, sendo que a quantidade de amostra é diretamente dependente da quantificação do DNA

purificado e assim esta solução foi multiplicada pelo número de *primers* utilizados no seqüenciamento (M13 sense e M13 antisense).

Após a realização deste procedimento o produto foi precipitado, colocando 80µL de etanol a 70% em cada alvéolo e incubado no escuro por 15 minutos.

A placa foi centrifugada a 4000 rpm por 45 minutos numa temperatura de 20°C e depois invertida em papel absorvente para descartar o sobrenadante. Então, foi centrifugada novamente, mas agora invertida, a 200 rpm por um minuto.

O procedimento foi repetido por mais uma vez, sendo que a segunda centrifugação foi realizada por 10 minutos.

A placa foi incubada em bloco aquecido a 94°C por um minuto para secar o *pellet* e armazenada fechada em freezer a -20°C, até o seqüenciamento.

Para o sequenciamento, o *pellet* foi ressuspendido em 15µL de formamida, e o DNA desnaturado a 94°C por cinco minutos. A placa foi colocada imediatamente no gelo por um minuto e, assim, posteriormente no sequenciador para ser lida.

A edição e análise das seqüências obtidas foram realizadas utilizando o Programa Sequencher versão 4.5 – Gene Codes Corporation.

3.6 Linearização de plasmídeo e transcrição *in vitro*

A linearização do plasmídeo recombinante, foi realizada usando-se uma enzima de restrição MSC I (New England BioLabs) numa reação com 15µg de DNA, conforme instrução do fabricante. Após este procedimento, o material foi visualizado por meio de uma eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE 1X com brometo de etídeo para verificar se todo o material havia sido digerido com a enzima. A banda de tamanho aproximado de 4383 pb foi recortada do gel e o produto purificado com o kit comercial (QIAquick Gel Extraction - Qiagen), conforme instruções do fabricante.

A reação de transcrição *in vitro* foi realizada primeiramente com o kit comercial RIBOMAX Large Scale RNA Production System – T7 (Promega), onde foi utilizado o produto purificado anterior, e conforme instruções do fabricante, foram incubados à 37°C por três horas 20µL do tampão 5X, 30µL de rNTPs (na concentração de 25mM), 40µL do DNA linear (≈ 10 µg) e 10µL de enzima.

Posteriormente, acrescentaram-se 15µL de DNase à reação, seguidos de nova incubação a 37°C por 15 minutos, para que houvesse a digestão do DNA alvo e incubação de 10 minutos a 95°C para a desnaturação da enzima.

O produto obtido foi purificado com o kit de extração em sílica líquida e a eluição do mesmo feita por duas vezes em 40µL cada, em Tampão de Eluição (Tris-EDTA 10/1mM), onde alíquotas de 11µL cada foram armazenadas no freezer a -80°C.

Para a verificação da eficiência da produção de RNA e da digestão enzimática por meio da DNase, duas PCRs foram realizadas, uma com transcrição reversa (para verificar a produção de RNA) e a outra sem a transcrição reversa (para verificar se ainda havia DNA alvo).

Como a quantidade de produto obtida com esse processo de linearização do plasmídeo e transcrição *in vitro* foi insuficiente e, repetida por diversas vezes sem obtenção de sucesso, um novo processo de linearização foi repetido da mesma forma como a anterior, mas a transcrição *in vitro* realizada com um outro kit (DuraScribe T7 Transcription kit - Epicentre Biotechnologies). O produto foi quantificado em espectrofotômetro (N-1000 - Nano Drop) e o cálculo para o número de cópias foi obtido através da seguinte fórmula:

$$\text{nº de cópias/uL} = [(m \times 10^{-6} \times 6,02 \times 10^{23}) / (\text{pb} \times 450)] / 1000$$

onde:

m = concentração medida em espectrofotômetro

pb = nº pares de bases plasmídeo + nº pares de bases do inserto

450 = massa molecular média dos nucleotídeos em fita simples

Com esse cálculo foi possível a construção de uma curva com diluições seriadas em fator 10 para a quantificação absoluta no sistema da PCR em Tempo Real.

3.7 Padronização da PCR em Tempo Real

3.7.1 Reação de transcrição reversa

Esta reação foi padronizada com o kit SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR System (Invitrogen), sendo que foram utilizados os seguintes reagentes em suas concentrações finais: Tampão 1X concentrado (contendo 4mM de cada dNTP), 0,4 μ M de *primer* antisense, 1 μ L de enzima SuperScript III RT/Platinum Taq MIX e q.s.p 10 μ L de Tampão de Eluição. Esta reação foi realizada para cada ponto da curva, onde foram adicionados 5 μ L do RNA (de cada diluição), seguindo duas incubações: a primeira em temperatura ambiente por 10 minutos e, posteriormente, a 50°C por 30 minutos, para a obtenção de cDNA.

3.7.2 Reação da PCR em Tempo Real

Esta reação foi padronizada com o kit SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR System (Invitrogen), e foram realizadas alguns experimentos para a otimização da reação, nos quais foram acertadas as concentrações de MgCl₂ (faixa de 5,5mM a 7,5mM) e *primers* (faixa de 0,2 μ M a 0,6 μ M), sendo que na reação otimizada foram utilizados os seguintes reagentes em suas concentrações finais: Tampão 1X concentrado (contendo 4mM de cada dNTP), MgCl₂ (6,5mM), *primer* sense (0,4 μ M), *probe* (0,1 μ M) e q.s.p. 35 μ L de Tampão de Eluição (Tris/EDTA 10/1mM). Esta solução foi adicionada à reação de transcrição reversa e incubada no termociclador Bio-Rad iCycler, onde ocorreu a amplificação do alvo em um ciclo de 95°C por 3 minutos, seguido de 45 ciclos de (94°C por 20 segundos e 60°C por 40 segundos).

A reação foi realizada em duplicatas para cada ponto da curva e o gráfico de resultado foi obtido pelo software “iCycler iQ Optical System Software Version 3.0a”.

O intra-ensaio foi realizado com uma reação onde todos os pontos da curva foram submetidos à PCR em Tempo Real em quadruplicatas e a reprodutibilidade do teste pôde ser avaliada por meio do cálculo do coeficiente de variação usando a seguinte fórmula:

$$CV=(DP/M)*100$$

onde:

CV= variabilidade expressa em porcentagem;

DP= desvio padrão

M= média aritmética

Com a curva de quantificação padronizada, os valores de concentração foram convertidos para log para a construção de uma reta de regressão logarítmica (Ct X log concentração) e realizados os cálculos dos coeficientes angular (inclinação/*slope*) e linear (intercepto). A eficiência da reação foi calculada com a seguinte fórmula (97):

$$(10^{(-1/inclinação)-1})*100$$

Após a realização dos ensaios e obtidos os valores dos Cts de cada amostra clínica, estes foram utilizados como valores para o eixo Y e, de acordo com eles, foram previstos os valores do eixo X, correspondentes à previsão da concentração em log.

3.7.3 Obtenção do controle positivo

O controle positivo para a reação da PCR em Tempo Real foi obtido através de uma diluição 1:10 em plasma limpo (sem marcadores para o HGV/GBV-C e demais testes sorológicos para doação de sangue negativos) de 1mL de plasma conhecidamente positivo para HGV/GBV-C congelado a -80°C como descrito no item 3.4.

Um volume de 1mL de plasma positivo para HGV/GBV-C foi descongelado à temperatura ambiente e homogeneizado. Este volume foi transferido para um tubo tipo falcon de 15mL que continha 9mL de plasma limpo. Essa diluição foi homogeneizada em vórtex durante aproximadamente 1 minuto e o volume total (10mL) aliqotado em microtubos com volume de 300µl cada.

Foram utilizadas 20 alíquotas desta diluição, que passaram pelas etapas de extração do RNA viral, transcrição reversa e PCR em Tempo Real. Dos resultados (Cts) obtidos foram calculados a média e o desvio padrão, para estabelecer o intervalo de Cts no qual as alíquotas de controle deveriam ter como resultado para validar a corrida quando as amostras clínicas fossem analisadas.

3.8 Demais Testes Laboratoriais

3.8.1 Carga viral do HIV

A carga viral do HIV foi realizada pelo laboratório de Retrovirologia, pertencente ao complexo UNIFESP – EPM, onde foi determinada por meio do teste COBAS AMPLICOR HIV-I MONITOR, do laboratório Roche®. O teste baseia-se em cinco etapas principais: extração do material genético do HIV-1 na amostra clínica; produção de cDNA por meio da transcrição reversa; amplificação por PCR do cDNA-alvo, usando iniciadores específicos complementares da região GAG do genoma do HIV-1; hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas e detecção dos produtos amplificados e ligados à sonda, por determinação colorimétrica e com auxílio de um sistema analisador automatizado.

Este teste possui uma faixa de detecção de 400 a 750.000 cópias/mL.

3.8.2 Contagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺

Esta técnica foi realizada pelo Laboratório de Imunologia I, pertencente ao complexo UNIFESP – EPM, onde a fenotipagem da população linfocitária foi realizada pela técnica de citometria de fluxo, através do citômetro de fluxo FACScalibur - BD®.

Inicialmente, o sangue total foi incubado com anticorpo monoclonal marcado contra o antígeno CD₄₅, com intuito de separar a população linfocitária do restante dos leucócitos do sangue circulante. Em seguida o sangue foi analisado pelo citômetro, que agrupou os variados tipos de leucócitos em um histograma (“*gating*” eletrônico). Os linfócitos assim agrupados (“*gated*”) foram separados em

subpopulações, após incubação com painel adequado de anticorpos monoclonais marcados.

3.9 Análise dos resultados

Foi utilizado o programa Excel para os cálculos de previsão da carga viral do HGV/GBV-C para os pacientes analisados e cálculos de linearização do ensaio.

E para as análises estatísticas dos resultados foi utilizado o programa SPSS, onde foi aplicado o teste ANOVA para a comparação das médias de carga viral, contagem de células T CD4⁺ e CD8⁺ entre os grupos. Também foram utilizados os testes de correlação de Pearson e de Spearman para avaliar a possível correlação entre as cargas virais do HIV e HGV/GBV-C e a correlação entre a carga viral do HGV/GBV-C e a contagem de células T CD4⁺ e CD8⁺.

4. Resultados

4. Resultados

4.1 *Primers* para o Sistema da PCR em Tempo Real

De acordo com a sequência U44402 e o consenso entre os pesquisadores em numerar as bases com números decrescentes e negativos a partir do códon de iniciação da tradução em direção a região 5'UTR (uma vez que a região 5'UTR não codifica nenhuma proteína), os *primers* e a sonda foram desenhados nas seguintes posições e possuem as seguintes sequências:

sense: -450 a -432 (18 nucleotídeos) 5' CGG CCA AAA GGT GGT GGA 3'

antisense -384 a -363 (21 nucleotídeos) 5' CTT AAG ACC CAC CTA TAG TGG 3'

sonda: -426 a -400 (26 nucleotídeos) 5' ATG CCA GGG TGG GTA GGT CGT AAA TC 3'

Mesmo após vários testes para detecção de uma amostra conhecida positivamente, estes *primers* falharam em amplificar a região genômica alvo do HGV/GBV-C. Assim, foram definidos os *primers* e sonda para a mesma região utilizando o software "Primer Express" versão 3.1 (Applied Biosystems). As sequências podem ser evidenciadas abaixo:

sense: -456 à -440 (16 nucleotídeos) 5' GGC GAC CGG CCA AAA G 3'

antisense: -418 à -388 (20 nucleotídeos) 5' CAA GGT GAC CGG GAT TTA CG 3'

sonda: -439 à -414 (25 nucleotídeos) 5' TGG TGG ATG GGT GAT GAC AGG GTT G 3'

A sonda foi marcada com FAM (6-carboxyfluoresceína) na porção 5' *repórter* e TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamina) na porção 3' *quencher*.

Estes *primers* foram testados numa reação de RT-PCR qualitativa, amplificando uma região de 89 pb, utilizando o mesmo protocolo para amplificação com os primers de Muerhoff, alterando somente a temperatura de anelamento dos *primers* que ficou em 58°C. A amplificação pode ser observada na seguinte foto, onde foi utilizado marcador 100pb (Invitrogen) para a visualização do tamanho da banda.

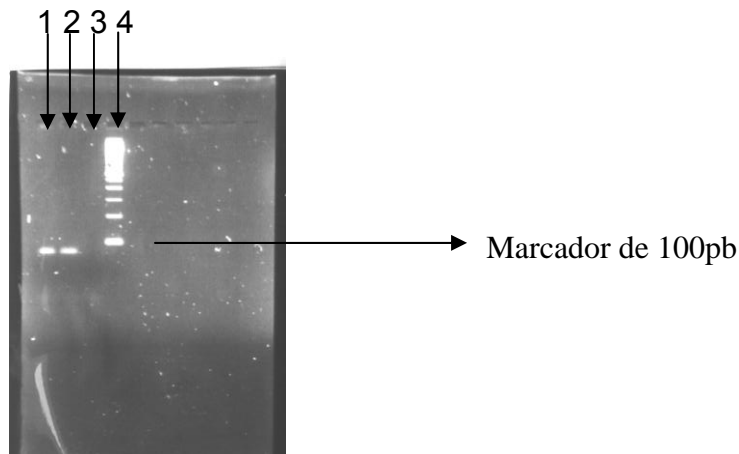


Foto 1. Gel de agarose a 1,5%. Canaleta 1 e 2: duplicatas da reação de PCR; Canaleta 3: controle negativo; Canaleta 4: padrão de peso molecular

4.2 Padronização da Curva para a PCR em Tempo Real

A produção de RNA sintético foi quantificada em 330 ng/ μ L, que equivale a $1,0123 \times 10^{11}$ genomas equivalentes/ μ L. A partir daí, foi construída uma curva com diluições seriadas em fator 10, com 9 ordens de magnitude (10^{10} a 10^2) para a quantificação absoluta no Sistema da PCR em Tempo Real. A reação foi realizada em duplicatas, obtendo-se os seguintes Cts de amplificação para cada ponto:

10^{10}	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2
10.4	12.5	20.5	26.4	29.6	30.3	32.5	34.4	33.9
10.2	12.9	21.5	28.6	29.1	30.5	32.7	34.2	31.8

Quadro 1. Cts de amplificação para cada ponto da curva com diluição de fator 10.

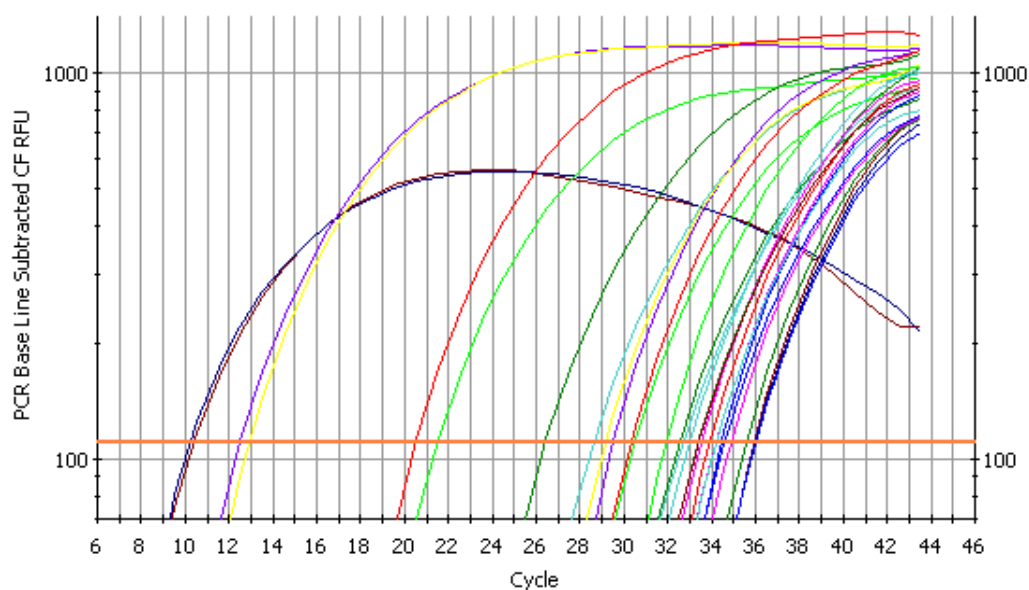


Gráfico 1. Sistema de quantificação da PCR em Tempo Real. O ciclo (Ct) em que a curva atravessa a linha vermelha (threshold) indica amplificação em fase exponencial.

Como as duplicatas não ficaram muito reprodutíveis, foram realizados alguns ensaios de padronização, onde foram alteradas as concentrações de MgCl_2 , e de acordo com a titulação do MgCl_2 foram obtidos os seguintes valores de Cts para os mesmos pontos da curva anterior:

	10^{10}	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2
MgCl₂ (7,5mM)	12.1	13.5	15.5	20.2	24.9	29.6	34.2	38.7	33.9
MgCl₂ (7,0 mM)	12	13.4	15.8	20.1	25.8	29.1	35.1	38.1	40.7
MgCl₂ (6,5mM)	11.9	13.7	16.1	20	25.1	29.5	34.7	38.2	41.9
MgCl₂ (6,0mM)	11.9	13.2	15.6	20.2	26.6	29.7	33.9	36.4	34.6
MgCl₂ (5,5mM)	12	13.3	15.8	20.4	26.2	29.7	32.5	34.7	33

Quadro 2. Valores de Cts para os ensaios de padronização com titulação de MgCl_2

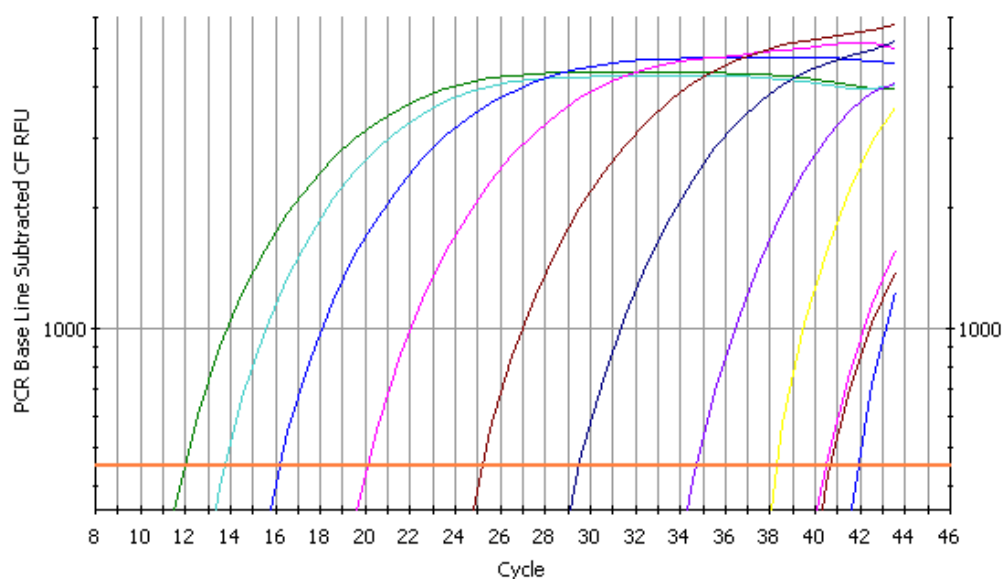


Gráfico 2. Quantificação da curva de diluição seriada em fator 10 com MgCl_2 a 6,5 mM.

Também foram realizados ensaios para a concentração de *primers*, onde foram obtidos os seguintes valores de Cts para os mesmos pontos da curva anteriores:

	10^8	10^7	10^4	10^3	10^2
Primers 0,2 uM	16.1	20	34.7	38.2	41.9
Primers 0,4 uM	15	18.7	32	35.3	37.4
Primers 0,6 uM	14.2	18.9	31.2	35.6	37.7

Quadro 3. Valores de Cts para os ensaios de padronização com diferentes concentrações de primers.

A padronização foi estabelecida com concentrações finais de cada *primer* (0,4 μM) e MgCl_2 (6,5mM). Seguem abaixo os valores de Cts da curva padronizada em quadruplicatas, juntamente com o cálculo do coeficiente de variação para cada ponto da curva:

Concent.	10^{10}	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2
Reação 1	11.5	13.3	15	20.2	23.7	27.9	32.7	36.2	37.4
Reação 2	11.5	13.5	14.7	20.4	24.2	27.7	33	36	37.3
Reação 3	11.5	14	15.1	20	23.6	28.3	32.7	35.6	37.9
Reação 4	11.3	13.8	14.8	20.2	23.8	27.7	32.9	35	37.5
C Variação	0,87%	2,27%	1,22%	0,80%	1,10%	1,01%	1,40%	1,48%	0,70%

Quadro 4. Valores de Cts para curva padronizada. *em azul, cálculo do coeficiente de variação para cada ponto da curva.

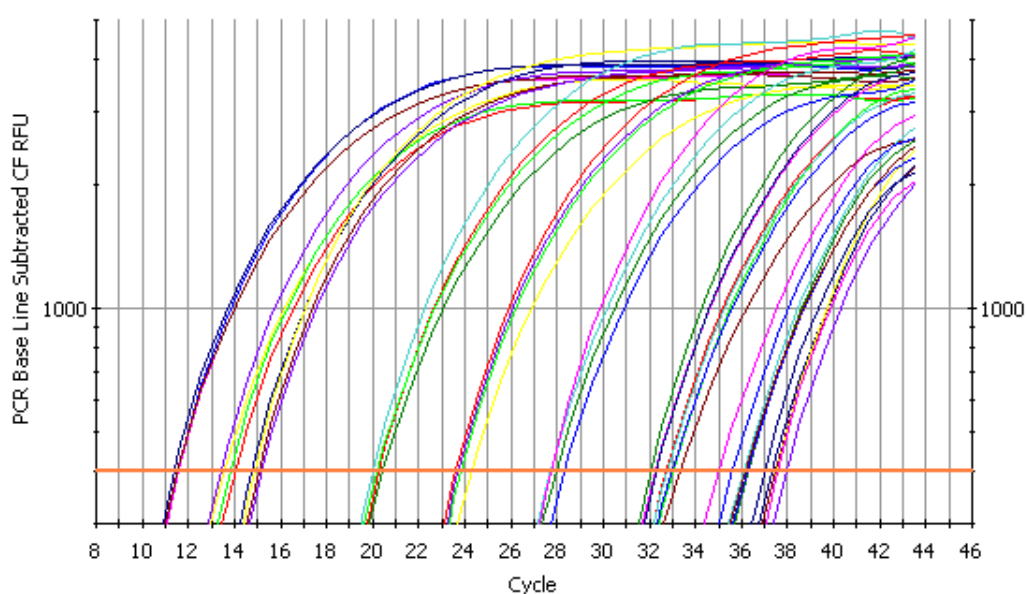


Gráfico 3. Curvas de quantificação absoluta em quadruplicatas.

A linearização do ensaio foi demonstrada pelo cálculo da inclinação da reta de regressão que é dada pelo coeficiente angular da reta (*slope*) e pelo coeficiente linear, que é o ponto em que a reta corta o eixo das ordenadas (intercepto).

A inclinação da reta foi de -3,56, o intercepto foi de 45,56, o coeficiente de correlação de Pearson foi de $r^2 = 0,99$ e a eficiência da reação foi de 90,9%.

A reprodutibilidade do teste foi avaliada com base na reação em quadruplicata da curva de quantificação considerada um intra-insaio e calculando-se o coeficiente de variação para cada ponto da curva. A maior variação foi obtida na quantificação de 10^9 e a menor variação no ponto de quantificação 10^2 , onde

respectivamente, obteve-se 2,27% e 0,7%, resultados que podem ser visualizados no quadro 4.

A linearização do ensaio para a quantificação do HGV/GBV-C foi estabelecida entre 10^{10} e 10^2 genomas equivalentes/ μ L.

4.3 Controle positivo

A média dos Cts obtidos no ensaio com 20 alíquotas do controle positivo foi de $35,8 \pm 1,95$ (variando de 33 a 39,6). Ficou estabelecido a faixa de detecção para o controle positivo entre os ciclos 33,8 a 37,8. O gráfico 4 representa o ensaio com os controles positivos.

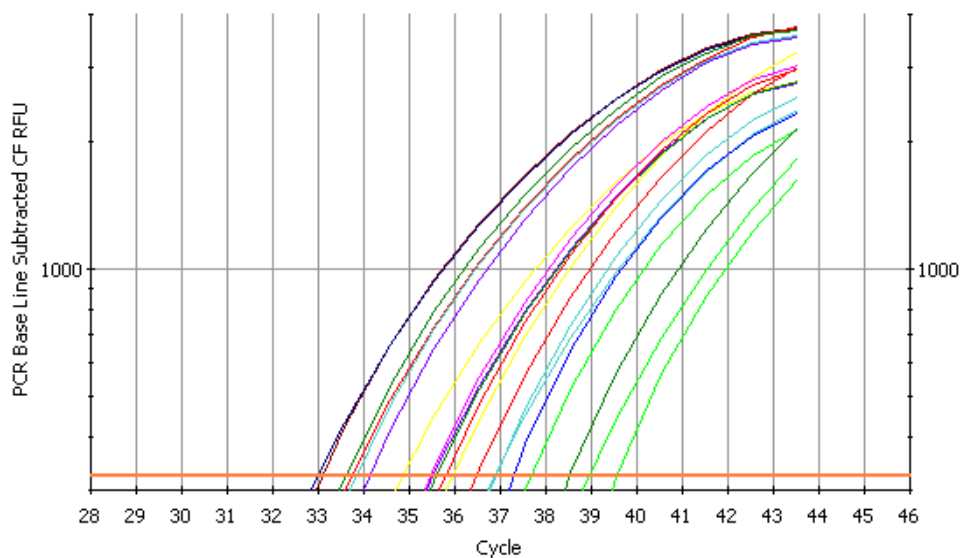


Gráfico 4. Ensaio com 20 alíquotas de controle positivo.

Em todos os ensaios com as amostras clínicas foi incluída uma alíquota do controle positivo que passou por todas as etapas do processo de quantificação do material genético, desde a extração do material genômico até a PCR em Tempo Real. O ensaio só foi validado se o controle positivo obteve como resultado um valor dentro da faixa de detecção estabelecida.

4.4 Amostras

No total, 102 pacientes participaram deste estudo, dentre os quais 57,8% eram do gênero masculino e a média de idade foi de 42 ± 9 anos (variando entre 23 e 67 anos). Todos os pacientes apresentavam infecção pelo HIV-1 e 41,1% (45) apresentavam co-infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV). A maioria dos pacientes (85,3%) estava em tratamento com terapia antiretroviral para o HIV.

Em relação à carga viral do HIV, 67,6% (69) dos pacientes possuíam carga indetectável, e dos que apresentavam carga viral detectável a média foi de $\log 4,49 \pm \log 0,79$ cópias/mL (variando entre $\log 2,79$ e $\log 5,84$ cópias/mL). Para as contagens de linfócitos T CD4⁺ no sangue, a média ficou em 484 ± 282 células/mm³ (variando de 4 a 1280 células/mm³) e para os linfócitos T CD8⁺ a média ficou em 881 ± 464 células/mm³ (variando de 117 a 2507 células/mm³).

Todos os pacientes foram testados quanto à presença e quantificação do RNA de HGV/GBV-C e a presença do anticorpo anti-E2.

Dos 102 pacientes, 21,5% (22) eram positivos para a detecção de RNA no plasma por meio da PCR em Tempo Real, com uma média de carga viral de $\log 3,62 \pm \log 0,65$ cópias/mL (variando de $\log 2,54$ a $\log 5$ cópias/mL). Para a pesquisa do anticorpo anti-E2, 26,4% (27) eram positivos, indicando infecção passada pelo HGV/GBV-C. Apenas 2 pacientes apresentaram ambos marcadores.

Após a realização destes testes, os pacientes foram alocados em 4 grupos:

- 1- Pacientes HIV e HIV/HCV (51)
- 2- Pacientes HIV, HIV/HCV e anti-E2 positivo (29)
- 3- Pacientes HIV, HIV/HCV e PCR GBV-C positivo (20)
- 4- Pacientes HIV, HIV/HCV, PCR GBV-C positivo e anti-E2 positivo (2)

Assim, os pacientes foram comparados dentro destes grupos para os marcadores imunológicos (contagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺) e virológicos (carga viral do HIV) da infecção pelo HIV.

Perfil dos pacientes do grupo 1 (N=51)					
	Média	Mediana	DP	Mínimo	Máximo
CV HIV	36.587	< 400	111.392	< 400	692.000
Contagem CD4	455	433	261	15	1280
Contagem CD8	877	782	508	121	2507

Tabela 3. Perfil imunológico e virológico do grupo de pacientes infectados somente pelo HIV ou co-infectados pelo HCV. Carga viral do HIV expressa em cópias/mL e contagem CD4/CD8 expressa em cels/mm3.

Perfil dos pacientes do grupo 2 (N=29)					
	Média	Mediana	DP	Mínimo	Máximo
CV HIV	49.967	< 400	122.552	< 400	526.000
Contagem CD4	556	578	322	4	1116
Contagem CD8	879	881	445	117	1867

Tabela 4. Perfil imunológico e virológico do grupo de pacientes infectados somente pelo HIV ou co-infectados pelo HCV com presença do anticorpo anti-E2 de HGV/GBV-C. Carga viral do HIV expressa em cópias/mL e contagem CD4/CD8 expressa em cels/mm3.

Perfil dos pacientes do grupo 3 (N=20)					
	Média	Mediana	DP	Mínimo	Máximo
CV HIV	1.590	< 400	4.348	< 400	15.600
Contagem CD4	478	374	277	101	1037
Contagem CD8	931	964	393	189	1707

Tabela 5. Perfil imunológico e virológico do grupo de pacientes infectados somente pelo HIV ou co-infectados pelo HCV e positivo para a presença de RNA de HGV/GBV-C (triplamente infectados). Carga viral do HIV expressa em cópias/mL e contagem CD4/CD8 expressa em cels/mm3.

Perfil dos pacientes do grupo 4 (N=2)					
	Média	Mediana	DP	Mínimo	Máximo
CV HIV	29.100	29.100	41.153	< 400	58.200
Contagem CD4	256	256	112	237	275
Contagem CD8	484	484	112	405	564

Tabela 6. Perfil imunológico e virológico do grupo de pacientes triplamente infectados (HIV/HCV/HGV-GBV-C) e com presença do anticorpo anti-E2 do HGV/GBV-C. Carga viral do HIV expressa em cópias/mL e contagem CD4/CD8 expressa em cels/mm3

Ao analisar a relação de pacientes com carga viral indetectável entre os grupos, nota-se que para o grupo infectado somente pelo HIV ou co-infectado pelo HCV, 66% possui carga viral indetectável para o HIV (N=51); já no grupo

triplamente infectado (HIV/HCV/HGV-GBV-C), 80% possui carga viral indetectável para o HIV (N=20).

Ainda que se observe uma média de carga viral do HIV menor no grupo de pacientes co-infectados pelo HGV/GBV-C (grupo 3) em relação aos outros grupos, não houve significância quando foi aplicado o teste estatístico ($p=0,467$). Se a comparação da carga viral for realizada com a mesma expressa em unidades log também não se observa significância estatística ($p=0,249$).

Também não houve significância estatística quando comparadas as médias dos grupos em relação à contagem de linfócitos T CD4⁺ ($p=0,297$), linfócitos T CD8⁺ ($p=0,643$) e idade ($p=0,331$).

Para o teste de correlação entre carga viral de HIV e carga viral do HGV/GBV-C, obtivemos o coeficiente de correlação de Spearman = $-0,237$, indicando fraca correlação negativa, ou seja, quanto maior a carga viral do HGV/GBV-C menor a carga viral do HIV. Se o teste for analisado mantendo-se a carga viral em log, o coeficiente de correlação de Spearman é igual a $-0,173$.

Para o teste de correlação entre carga viral do HGV/GBV-C expressa em log e a contagem de linfócitos T CD4⁺, obtivemos o coeficiente de correlação de Pearson de $0,243$, indicando fraca correlação positiva, ou seja, quanto maior a carga viral do HGV/GBV-C maior a contagem de células T CD4⁺.

Não houve correlação para o teste entre carga viral do HGV/GBV-C expressa em log e a contagem de linfócitos T CD8⁺, no qual o coeficiente de correlação de Pearson foi igual a $-0,007$, estando muito próximo a zero.

5. Discussão

5. Discussão

Conforme o relatório anual do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS, existem no mundo aproximadamente 33 milhões de pessoas vivendo com HIV/AIDS ⁽⁹³⁾.

No Brasil, o Ministério da Saúde aponta que já foram identificados cerca de 430 mil casos de AIDS, desde a identificação do primeiro caso em 1980 até junho de 2006. A taxa de incidência foi crescente até metade da década de 90, alcançando, em 1998, aproximadamente 19 casos de AIDS por 100 mil habitantes ⁽⁹³⁾.

Do total de casos de AIDS, cerca de 80% concentram-se nas regiões Sudeste e Sul. O Sudeste é a região mais atingida desde o início da epidemia e, apesar da alta taxa de incidência, mantém-se num processo de estabilização ⁽⁹³⁾.

Em 2004, uma pesquisa de abrangência nacional estimou que no Brasil cerca de 593 mil pessoas, entre 15 a 49 anos de idade, vivem com HIV e AIDS. Deste número, aproximadamente 208 mil são mulheres e 385 mil são homens ⁽⁹³⁾.

O tempo médio da infecção pelo HIV até o desenvolvimento de infecções oportunistas definidoras da AIDS ocorre entre 7 e 10 anos, mas a AIDS pode se desenvolver dentro de um ano de infecção ou pode não se desenvolver por mais de 20 anos após a soroconversão. Numerosos estudos têm verificado que fatores virais e do hospedeiro estão associados com o curso da doença pelo HIV ⁽²⁸⁾.

Devido ao HGV/GBV-C compartilhar as mesmas vias de transmissão que o HIV, a infecção pelo HGV/GBV-C é muito comum entre os pacientes infectados pelo HIV. Assim, tentando relacionar alguma patologia associada ao HGV/GBV-C em pacientes infectados pelo HIV, pesquisadores acabaram verificando que a infecção pelo HGV/GBV-C, nesses pacientes, poderia estar associada ao declínio da mortalidade e a melhores resultados clínicos se comparados a pacientes que apresentavam apenas a infecção isolada pelo HIV ^(34,41,48,63,64,98,69,70).

Embora essas associações não sejam consensuais entre os pesquisadores, visto que alguns trabalhos falharam em demonstrar qualquer efeito benéfico da infecção pelo HGV/GBV-C em relação ao curso da infecção pelo HIV ^(35,59,81,82) e, sabendo-se que podem existir muitos outros fatores associados à sobrevida, como fatores virológicos, imunológicos e genéticos do

hospedeiro que contribuem para o curso da infecção pelo HIV, o desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção e quantificação do HGV/GBV-C pode ajudar a melhor compreender essa interação viral. A avaliação das cargas virais de ambos agentes envolvidos numa co-infecção fornece referenciais úteis para se estabelecer interações entre os vários fatores envolvidos nessa complexa relação.

Pelo fato do HGV/GBV-C não estar associado a nenhuma patologia, não existem kits comerciais para detecção da carga viral para este agente, assim como não se faz triagem em bancos de sangue, embora essa infecção seja muito prevalente nesta população (cerca de 9,5% dos doadores saudáveis possuem RNA de HGV/GBV-C) estudada no Brasil ⁽⁴⁵⁾.

Assim, o desenvolvimento da técnica da PCR em Tempo Real para a detecção e quantificação do HGV/GBV-C pode ser útil para a triagem de pacientes soropositivos para HIV, co-infectados pelo HGV/GBV-C, na pesquisa dos possíveis efeitos benéficos deste vírus em relação ao curso da doença causada pelo HIV. Além disso, poderá ser útil para um futuro tratamento destes pacientes, triando-os quanto à infecção, se houver a confirmação do efeito benéfico dado devido a essa interação viral.

Outra situação na qual a pesquisa do RNA do HGV/GBV-C pode ser importante é aquela em que pacientes soropositivos para HIV estejam co-infectados pelo vírus da hepatite C, situação também bastante freqüente e cuja interação é objeto de intensas investigações na área de Gastroenterologia e Infectologia. Procura-se avaliar qual o papel exercido pela ação do HGV/GBV-C sobre o HIV e, nesse equilíbrio, qual seria a resultante sobre o HCV.

Nosso grupo, na Disciplina de Infectologia da UNIFESP, associado ao grupo de Hepatites Virais da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da UNIFESP vem trabalhando há alguns anos com pacientes, tanto mono, como co-infectados com os vírus HIV-1, HCV e HGV/GBV-C, como com todas as combinações de infecções duplas e triplas, no intuito de compreender melhor essas interações e seu impacto no hospedeiro. Para isso, ferramentas como a avaliação da carga viral dos vírus, por um processo altamente sensível e reprodutível, é fundamental.

O método molecular da PCR em Tempo Real escolhido para nosso estudo foi o que emprega *probes* hidrolisáveis (Taqman), por apresentar maior sensibilidade e especificidade. Este sistema se baseia na ligação de dois *primers*

e uma *probe* a uma região gênica, sendo que a *probe* se liga primeiro à sequência alvo, seguido dos *primers*, por diferença na temperatura. A *probe* possui uma molécula de fluoresceína na porção 5' (*reporter*) e, na porção 3', um outro reativo (*quencher*) que, por meio da proximidade das duas regiões, não permite que haja escape de fluorescência ⁽⁸⁹⁾. A separação do *reporter* e do *quencher* se dá pela atividade 5' exonuclease da enzima Taq polimerase, que durante a polimerização da fita que está sendo gerada, cliva a *probe* liberando assim o sinal de fluorescência, que é captada por filtros.

A maioria, senão todos, os trabalhos realizados para a quantificação da carga viral do HGV/GBV-C têm utilizado esta técnica de detecção, por ser considerada melhor do que a detecção realizada por SybrGreen, um reativo intercalante que exige uma etapa final, a curva de aumento gradativo de temperatura ("melting curve") para discriminar os produtos específicos dos não específicos gerados durante a reação.

No Brasil, ainda não foram publicados trabalhos a respeito de testes de quantificação da carga viral do HGV/GBV-C, embora existam alguns trabalhos relatando a epidemiologia e a diversidade de genótipos encontrados em nossa população ^(26,27,45,46).

A escolha da região genômica para o desenvolvimento da técnica foi de suma importância, uma vez que era essencial que fosse uma região conservada entre os genótipos. Na literatura, as regiões preferidas pelos pesquisadores têm sido a 5' UTR ou a NS3 (região que codifica a helicase viral) para o desenvolvimento de técnicas moleculares. Entretanto, para o desenvolvimento de técnicas quantitativas a maioria, senão todos os trabalhos, utilizaram a região 5' UTR ^(24,25,31,32,33) e, assim, resolvemos utilizar esta mesma região para o desenvolvimento no nosso ensaio quantitativo.

Para a análise das sequências e o desenho dos *primers* que serviriam para a detecção no Sistema da PCR em Tempo Real, o cuidado no alinhamento, dando preferência para sequências brasileiras e de países vizinhos, foi decorrente do fato de que os diferentes genótipos existentes apresentam uma distribuição geográfica relativamente estável numa dada região. Como mencionado anteriormente, sabe-se que os genótipos 1 e 5 são mais encontrados na África, o genótipo 2 na Europa, 3 na Ásia e 4 no sul da Ásia. O genótipo 3 é também

encontrado na América do Sul e o genótipo 2, além de encontrado na Europa, pode ser encontrado na América do Norte ^(6,23). Trabalhos realizados aqui no Brasil já verificaram a presença dos genótipos 1, 2 e 3 ^(26,27).

Analisando os *primers* desenhados inicialmente e os que o programa “Primer Express” (Applied Biosystems) sugeriu para a realização do estudo, verifica-se que, na sequência do *primer* sense desenhado pelo programa, existe um deslocamento de 6 bases na direção 3’ em relação ao *primer* sense desenhado inicialmente, sugerindo que a região escolhida realmente foi a região apropriada para o desenvolvimento do nosso estudo. Acreditamos que os primeiros *primers* não funcionaram devido à formação de dímeros entre eles, uma vez que, quando colocados separadamente, como por exemplo, o *primer* sense juntamente com o antisense de Muerhoff, a reação funcionou, verificando-se banda de amplificação na migração por eletroforese em gel de agarose (dados não mostrados).

No processo de quantificação molecular, há necessidade de se estabelecer uma curva de referência que servirá de base para a quantificação das cargas virais das amostras clínicas. Nesse sentido, a produção de RNA sintético por meio da reação de transcrição *in vitro* foi necessária porque o vírus estudado é um vírus RNA e, desta forma, não poderia ser comparada uma curva de quantificação construída com cDNA com as amostras clínicas que seriam de RNA. Sabe-se que, na reação de transcrição reversa, parte do material alvo pode não ser transcrito e, se tivéssemos uma curva de cDNA, esta estaria superestimada em relação às amostras clínicas, que necessitam passar pela etapa de transcrição reversa.

Para a produção deste RNA sintético, encontramos inúmeros problemas durante o andamento do trabalho, sendo até mesmo necessário fazer a troca do kit comercial utilizado para esta reação. Embora alguns trabalhos tenham relatado sucesso ao realizar este procedimento como o kit RIBOMAX Large Scale RNA Production System – T7 (Promega) ^(31,32), obtivemos uma reação mais eficiente quando utilizamos o kit DuraScribe T7 Transcription kit (Epicentre Biotechnologies), porque conferiu maior produção e maior estabilidade ao RNA sintético. Como se sabe, o RNA é uma molécula muito instável, de fácil

degradação e, com esse kit, obtivemos maior estabilidade do RNA produzido, o que não foi verificado com o kit RIBOMAX.

A reprodutibilidade da técnica da PCR em Tempo Real foi avaliada pelo estudo da variabilidade obtido pelo intra-ensaio, no qual foram calculados os valores do coeficiente de variação entre as detecções para cada ponto da curva. A média do coeficiente de variação foi de 1,2%. Castelain e colaboradores ⁽³¹⁾ obtiveram em seu trabalho um coeficiente de variação intra-ensaio de 1,8% e Sauleda e colaboradores ⁽³²⁾ um valor de 1,25%. Assim, verifica-se que a técnica padronizada por nós possui boa reprodutibilidade, estando na faixa de variação obtida por outros pesquisadores.

A curva de quantificação absoluta com 9 ordens de magnitude também condiz com o encontrado na literatura, sendo que Castelain e colaboradores ⁽³¹⁾ construíram uma curva de 5 ordens de magnitude (10^7 a 10^3), Sauleda e colaboradores ⁽³²⁾ uma com 6 ordens de magnitude (10^8 a 10^3) e Hattori e colaboradores ⁽²⁵⁾ construíram uma curva com 8 ordens de magnitude (10^8 a 10^1), todos eles tendo como objetivo a detecção e quantificação do HGV/GBV-C.

Quando analisamos os pacientes que participaram do estudo, verificamos que nessa população, a presença de infecção ativa pelo HGV/GBV-C foi demonstrada em 22% dos pacientes infectados pelo HIV, índice que está na faixa descrita nos trabalhos encontrados na literatura, que é de 15 a 35% ^(59,66,67,69).

Quanto à presença de anticorpos anti-E2, referindo contato prévio com o vírus, nossa população mostrou positividade inferior à encontrada na literatura, apenas 26,4%, sendo que se esperava encontrar índices em torno de 40 a 50% de positividade ⁽²⁸⁾. Apenas 2 indivíduos (aprox. 2%) apresentaram infecção ativa pelo HGV/GBV-C e anticorpos anti-E2 ao mesmo tempo. Refere-se na literatura que aproximadamente 1% da população apresenta simultaneamente ambos marcadores e, neste caso, sugere-se que estes pacientes estão na fase de resolução da infecção, uma vez que ambos possuem carga viral do HGV/GBV-C bastante baixa (25.501 e 8.624 cópias/mL).

Não houve significância estatística quando comparados os grupos com presença ou não de marcadores da infecção pelo HGV/GBV-C, em relação à carga viral do HIV, contagem de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺, e isto pode ser devido à casuística pequena de pacientes incluídos no estudo. Ainda assim,

nota-se que o grupo com presença de RNA de HGV/GBV-C possui maior número de pacientes com carga indetectável do HIV e com média de carga viral menor do que os outros grupos. Considerando que não havia diferença no percentual de pacientes fazendo uso de terapia antiretroviral em ambos os grupos, talvez esses dados reflitam algum impacto da infecção pelo HGV/GBV-C na replicação do HIV, conforme sugerido pela maior parte dos autores ^(8,34,41,70).

Dos 22 pacientes positivos para a presença de RNA de HGV/GBV-C, 3 deles estavam sem terapia antiretroviral e apresentaram carga viral do HGV/GBV-C bastante alta (log 4,03, log 3,95 e log 4,23 cópias/mL); dois deles possuem carga viral do HIV indetectável e alta contagem de células T CD4⁺ (409 e 893 células/mm³), corroborando os dados encontrados na literatura, que sugerem efeito benéfico ao paciente HIV quando na presença da infecção pelo HGV/GBV-C. Entretanto, como a casuística de pacientes sem uso de terapia antiretroviral é extremamente pequena nesse grupo (apenas 3 pacientes), não seria possível a obtenção de um resultado estatisticamente significativo.

Quando analisadas as correlações entre a carga viral do HIV e do HGV/GBV-C, notou-se uma fraca correlação negativa, indicando que, quanto maior a carga viral do HGV/GBV-C, menor a carga viral do HIV, o que está de acordo com os achados na literatura ^(8,63,70). Além disso, observamos também uma fraca correlação positiva quando comparados a carga viral do HGV/GBV-C e o número de linfócitos T CD4⁺. Todavia, em nossa população estudada não podemos atribuir essa supressão da carga viral do HIV à presença do HGV/GBV-C uma vez que 85,3% dos pacientes estão fazendo uso da terapia antirretroviral, o que, conseqüentemente, diminui a replicação viral do HIV e pode aumentar a contagem de linfócitos T CD4⁺, que são menos depletados pela baixa carga viral do HIV. Isso, indiretamente, poderia aumentar a replicação viral do HGV/GBV-C que compete pelo mesmo sítio de replicação do HIV. Por outro lado, o paciente HGV/GBV-C positivo que possui a maior carga viral nessa população estudada (log 5 cópias/mL) possui baixa contagem de linfócitos T CD4⁺ (apenas 275 células/mm³), indicando que esta replicação pode não estar associada apenas à quantidade dessas células, uma vez que este é um vírus panlinfocitário ⁽²²⁾.

Seria necessário estudar uma coorte de pacientes infectados pelo HIV que ainda não estivesse fazendo uso de terapia para que pudéssemos inferir esse

efeito benéfico ao HGV/GBV-C. Além disso, como mencionado anteriormente, muitos outros fatores podem estar relacionados à progressão da doença pelo HIV; então, seria necessário fazer um estudo prospectivo mais amplo, provavelmente multicêntrico, no qual se pudessem verificar outros parâmetros, como HLA do hospedeiro, mutação no gene que codifica o co-receptor para o HIV - CCR5 ($\Delta 32$), separando os pacientes em progressores rápidos, lentos e não-progressores e incluindo o subtipo do HIV para cada grupo. Assim, poderíamos verificar com maior acurácia o possível efeito benéfico exercido pela infecção do HGV/GBV-C em pacientes infectados pelo HIV-1.

Vários outros estudos no nosso grupo estão em andamento, incluindo a detecção e localização do HGV/GBV-C no hepatócito e nas sub-populações leucocitárias, bem como estudos de resposta imune e produção de citocinas nas infecções isoladas e combinadas e, para esses estudos está sendo essencial o emprego dessa metodologia de quantificação da carga viral desse agente.

6. Conclusões

6. Conclusões

- A padronização da técnica da PCR em Tempo Real para a detecção do HGV/GBV-C em plasma foi obtida com sucesso e está de acordo com dados de outros trabalhos realizados na mesma área.
- Existe alta prevalência de infecção pelo HGV/GBV-C entre os pacientes infectados pelo HIV, de acordo com os dados descritos na literatura.
- Não houve significância estatística na comparação entre as médias de carga viral do HIV e contagem de células T CD4⁺, entretanto, devido à nossa casuística ser pequena, mais estudos nessa área deverão ser realizados para esclarecimento destas questões.
- Houve fraca correlação negativa quando analisadas as cargas virais do HIV e do HGV/GBV-C sugerindo que poderia haver uma competição entre estes vírus pelo sítio de replicação viral e que isso poderia diminuir a carga viral do HIV, dados que conferem com alguns trabalhos, entretanto, como a maioria dos pacientes se encontra sob tratamento de terapia antiretroviral e possuímos uma casuística pequena, outros fatores poderiam estar contribuindo para estes resultados.

7. Anexos

Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado(a) para participar da pesquisa “Importância clínica e impactos imunológico e virológico da co-infecção HIV/HCV/GBV-C”.

O vírus da “hepatite G” foi descoberto em 1995 e acredita-se que não cause doenças. Porém, recentemente alguns pesquisadores descobriram que nas pessoas com infecção pelo HIV, o vírus da hepatite G poderia atrasar a evolução para Aids.

Logo, os objetivos desta pesquisa são:

1. estimar quantos pacientes tem hepatite G entre os pacientes com infecção pelo HIV e co-infecção pelo HIV e pelo vírus da hepatite C atendidos na Unidade Ambulatorial da DIPA (CCDI) do Hospital São Paulo.
2. estudar a relação da hepatite G com a imunidade, com a carga viral do HIV, com o estado do fígado e com as características do vírus da hepatite C nas pessoas que tenham também esta infecção.

Caso você participe, será entrevistado(a) para conhecermos seus hábitos de vida e seu histórico médico. A entrevista é individual, com privacidade e sigilo das informações.

Será necessário colher sangue para pesquisarmos o vírus da hepatite G, a carga viral do HIV, a contagem de CD4 e de exame para sabermos se o fígado está inflamado (ALT). Também faremos exame de triagem para hepatite B. A coleta de sangue será feita por punção de veia do antebraço, o que pode causar um pouco de dor, ficar roxo (hematoma) no local ou até causar tontura passageira. No total serão necessários 100 mL de sangue, o que corresponde a aproximadamente 10 colheres de sopa de sangue.

Se você tem hepatite C, será necessário colher sangue adicional para exames que vão estudar o vírus da hepatite C. Será necessário mais 20 mL de sangue, o que corresponde a aproximadamente 2 colheres de sopa de sangue. Caso os resultados destes exames mostrem que você é um(a) candidato(a) potencial ao tratamento da hepatite C, será necessário fazer uma biópsia do fígado. Este exame consiste em retirar um pequeno pedaço do fígado por punção com uma agulha especial, com auxílio de ultrassom e anestesia local. Pode haver dor durante ou depois do exame e pode acontecer sangramento no fígado que, se for grande, pode levar à necessidade de operação (isto acontece em cerca de 1% das biópsias). Outra complicação possível é a agulha atingir outros órgãos como o pulmão, a vesícula biliar, o intestino ou rim. Se isto acontecer pode ser necessário operar também. Por causa destes riscos você ficará em observação por pelo menos 6h após a biópsia. Caso você já tenha feito biópsia do fígado há até um ano da data de hoje, usaremos os resultados desta biópsia na pesquisa.

Em caso de dúvida você pode procurar a investigadora principal, que é a Dra. Graziela Lanzara, na Rua Loefgren 1588 ou no tel. 55735081. Você também pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP:

R. Botucatu, 572, 1º andar/cj 14, tel: 5571-1062, FAX: 5539-7162, E-mail: cepunifesp@epm.br

Sua participação não é obrigatória e se você não quiser participar não haverá nenhum prejuízo no seu acompanhamento e na sua relação com a pesquisadora ou com a instituição. Caso decida participar, está garantido que o(a)

sr.(a) poderá desistir a qualquer momento, sem motivo ou aviso prévio, também sem prejuízo no seu acompanhamento.

Os dados referentes ao(à) sr.(a) serão sigilosos e privados, sendo que o(a) sr.(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma.

Não haverá nenhum gasto e você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será paga pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), você terá direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Os dados e o material coletado serão utilizados somente para esta pesquisa.

Após ter sido esclarecido(a) sobre a pesquisa, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido(a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Impacto da infecção pelo vírus da hepatite G em pacientes com infecção pelo HIV e co-infecção pelo HIV e pelo vírus da hepatite C”.

Eu discuti com a Dra. Graziela Lanzara sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Celso F. H. Granato
(ou Pesquisador que obteve o TCLE)

Assinatura do Voluntário

São Paulo, __ de _____ de 200__

Anexo 2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 14 de outubro de 2005.

CEP 1296/05

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) **CELSO FRANCISCO H GRANATO**

Co-Investigadores: Graziela de Almeida Lanzara, Viviane Kelly Alves, Giovana Lótici Baggio, Aline de Jesus Barbosa
Disciplina/Departamento: Doenças infecciosas e Parasitárias/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Importância clínica e impactos imunológicos e virológicos da co-infecção HIV/HCV/GBV-C-HGV"**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Intervenção diagnóstica.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: risco maior do que médio, desconforto intenso, envolvendo coleta de sangue e biópsia hepática.

OBJETIVOS: Estabelecer metodologias para identificação do estado infeccioso de pacientes infectados pelo HIV-1, com relação ao GBV-C/HGV e o HCV. Avaliar o impacto da co-infecção pelos vírus GBV-C/HGV, HCV e HIV-1 em um mesmo paciente, em relação a combinações de co-infecções distintas, em seus aspectos clínicos, bioquímicos, imunológicos, virológicos e histo-patológicos.

RESUMO: Envolvem agentes patogênicos. O estudo será desenvolvido na Unidade Ambulatorial da DIPA/UNIFESP, com colaboração do laboratório de Patologia e de Ginecologia Molecular da UNIFESP. A amostra será constituída de 100 pacientes com infecção pelo HIV e 100 pacientes com co-infecção HIV-HCV entre 18 e 70 anos. Será realizada uma entrevista e coleta de sangue para pesquisa de GBV-C/HGV RNA no plasma, pesquisa de anticorpos anti-E2, contagem de linfócitos T CD4+, população celulares T, níveis séricos de ALT e bioquímica geral. Os pacientes com anti-HCV positivo deverão colher sangue também para pesquisa de HCV RNA e determinação do genótipo do HCV através da análise da região genômica codificadora da proteína do envoltório E1, da proteína core e da proteína não estrutural NS5B. Os participantes com potencial indicação de tratamento anti-HCV serão submetidos à biópsia hepática percutânea guiada por ultra sonografia.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo fundamentado, multidisciplinar, analisando aspectos clínicos, imunológicos e virológicos da co-infecção HIV/HCV/GBV-C-HGV.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos, envolvendo laboratórios especializados com domínio das técnicas empregadas.

TCLE: Adequado, de acordo com a resolução 196/96.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R\$ 67 823 + US\$ 17 342,00.

CRONOGRAMA: 18 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: mestrado/doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 9/10/2006 e 4/10/2007.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

Rua Botucatu, 572 - 1º andar - conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

8. Referências

8. Referências

1. Deinhardt F, Holmes AW, Capps RB, Popper H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. *J Exp Med* 1967; 125:673-688.
2. Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, *et al.* Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3401-3405.
3. Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, *et al.* Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol* 1995;69:5621-5630.
4. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, *et al.* Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1995; 1: 564-569.
5. Linnen J, Wages J, Zhang-Keck Z-Y, *et al.* Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: A transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271:505-508.
6. Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN, *et al.* Sequence and genomic organization of GBV-C: A novel member of the Flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J Med Virol* 1996; 48:60-67.
7. Smith DB, Simmonds P, Frost S, *et al.* Phylogenetic analysis of GBV-C/hepatitis G virus. *J Gen Virol* 2000; 81:769-780.
8. Xiang J, Wunschmann S, Schmidt WN, Shao J, Stapleton JT. Full-length GB virus C (hepatitis G virus) RNA transcripts are infectious in primary CD4-positive T cells. *J Virol* 2000; 74:9125-9133.
9. Okamoto H, Nakao T, Inoue M, *et al.* The entire nucleotide sequence of two GB virus C/hepatitis G virus isolates of distinct genotypes from Japan. *J Gen Virol* 1997;78:737-745.
10. Xiang J, D. Klinzman, J. McLinden, W.N.Schmidt, D.R.LaBrecque, R.Gish, and J.T.Stapleton. Characterization of hepatitis G virus (GB virus C) particles: evidence for a nucleocapsid and expression of sequences upstream of the E1 protein. *J Virol* 1998;72:2738-2744.
11. Xiang J, Daniels KJ, Soll DR, Schmidt WN, LaBrecque DR and Stapleton JT. Visualization and characterization of GB virus C particles: evidence for a nucleocapsid. *J Viral Hepat* 1999; 6 (Suppl.1): 16-22.
12. Laras A, Zacharakis G, Hadziyannis SJ. Absence of the negative strand of GBV-C/HGV RNA from the liver. *J Hepatol* 1999;30:383-388.

13. Kanda T, Yokosuka O, Ehata T, *et al.* Detection of GBV-C RNA in patients with non-A-E fulminant hepatitis by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Hepatology* 1997;25:1261-1265.
14. Seipp S, Scheidel M, Hofmann WJ, Tox U, *et al.* Hepatotropism of GB virus C (GBV-C): GBV-C replication in human hepatocytes and cells of human hepatoma cell lines. *J Hepatol* 1999;30:570-579.
15. Seipp S, Goeser T, Theilmann L, Kallinowski B. Establishment of a highly specific detection system for GB virus C (GBV-C) minus-strand RNA. *Virus Res* 1998;56:183-189.
16. Fogeda M, Navas S, Martin J, Casqueiro M, Rodriguez E, Arocena C, Carreno V. In vitro infection of human peripheral blood mononuclear cells by GB virus C/hepatitis G virus. *J Virol* 1999;73:4052-4061.
17. Kobayashi M, Tanaka E, Nakayama J, Furuwatari C, Katsuyama T, *et al.* Detection of GB virus C/HGV genome in peripheral blood mononuclear cells and liver tissue. *J Med Virol* 1999;57:114-121.
18. Mellor J, Haydon G, Blair C, Livingstone W, Simmonds P. Low levels or absent in vivo replication of hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* 1998;79:705-714.
19. Laskus T, Radkowski M, Wang L, Vargas H and Rakela J. Detection of Hepatitis G virus replication sites by using highly strand-specific Tth-based reverse transcriptase PCR. 1998. *J Virol* 72: 3072-3075.
20. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. Lack of evidence for hepatitis G virus replication in the livers of patients coinfecting with hepatitis C and G viruses. *J Virol* 1997a;71:7804-7806.
21. Tucker TJ, Smuts HEM, Eedes C, *et al.* Evidence that the GBV-C/hepatitis G virus is primarily a lymphotropic virus. *J Med Virol* 2000; 61:52-58.
22. George SL, Varmaz D and Stapleton JT. GB Virus C replicates in primary T and B lymphocytes. *Journal of Infect Diseases* 2006;193:451-4.
23. Polgreen PM, Xiang J, Chang Q and Stapleton JT. GB virus type C/hepatitis G virus: a non-pathogenic flavivirus associated with prolonged survival in HIV-infected individuals. *Micr Infec* 2003;5:1255-1261.
24. Hattori J, Okumura N, Yamazaki Y, Uchiyama M, Hamaguchi M, Nishiyama Y and Kaneda T. Beneficial effect of GB virus C co-infection in human immunodeficiency virus type-1 infected individuals. *Microbiol Immunol* 2007; 51:193-200.

25. Hattori J, Ibe S, Nagai H, Wada K, Morishita T, Sato K, Utsumi M and Kaneda T. Prevalence of infection and genotypes of GBV-C/HGV among Homosexual Men. *Microbiol Immunol* 2003;47:759-763.
26. Oliveira LA, Martins RM, Carneiro MA, *et al.* Prevalence and genotypes of GB virus C/hepatitis G virus among blood donors in Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(7):953-7.
27. Nishiya A.S., Ribeiro-dos-Santos G., Bassit L., *et al.* Genotype distribution of the GB virus C in citizens of Sao Paulo City, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003;45(4):213-6.
28. Stapleton JT, Williams CF, Xiang J. GB Virus Type C: a Beneficial infection? *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3915-3919.
29. Dawson GJ, Schlauder GG, Pilot-Matias TJ, *et al.* Prevalence studies of GB virus-C using reverse-transcriptase-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1996; 50:97-103.
30. Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Roudot-Thoraval R, *et al.* GBV-C/hepatitis G virus (HGV) RNA load in immunodeficient individuals and immunocompetent individuals. *J Med Virol* 1999; 59:32-37.
31. Castelain S, François C, Bonte D, *et al.* Epidemiological and Quantitative study of GBV-C infection in French Polytransfused Children. *J Med Virol* 2004;73:596-600.
32. Saulea S, Reesink HJ, Esteban JI, Hess G, Esteban R and Guardia J. Profiles of GBV-C/Hepatitis G Virus markers in patients coinfecting with hepatitis C virus. *J Med Virol* 1999;59:45-51.
33. George SL, Xiang J and Stapleton JT. Clinical isolates of GB virus type C vary in their ability to persist and replicate in peripheral blood mononuclear cell cultures. *Virology* 2003; 316:191-201.
34. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, *et al.* Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2001;345:715-724.
35. Van der Bij AK, Kloosterboer N, Prins M, *et al.* GB virus C coinfection and HIV-1 disease progression: The Amsterdam Cohort Study. *J Infect Dis* 2005;191:678-685.
36. Dille BJ, Surowy TK, Gutierrez RA, Coleman PF, *et al.* An Elisa for detection of antibodies to the E2 protein of GB virus C. *J Infect Dis* 1997;175:458-461.
37. Heringlake S, Trautwein C, *et al.* Antibodies against the GB virus C envelope 2 protein before liver transplantation protect against GB virus C de novo infection. *Hepatology* 1998;28:379-84.

38. Silini E, Belli L, Alberti A, *et al.* HGV/GBV-C infection in liver transplant recipients: antibodies to the viral E2 envelope glycoprotein protect from de novo infection. *J Hepatol* 1998;29:533-40.
39. Feucht HH, Zollner B, Polywka S, Knodler B, Schroter M, Nolte H, *et al.* Prevalence of hepatitis G viremia among healthy subjects, individuals with liver disease, and persons at risk for parenteral transmission. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 767–8.
40. Halasz R, Weiland O, Sallberg M. GB Virus C/Hepatitis G virus. *Scand J Infect Dis* 2001;33: 572–580.
41. Heringlake S, Ockenga J, Tillmann HL, *et al.* GB virus C/hepatitis G virus infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients? *J Infect Dis* 1998;177:1723-1726.
42. Alter MJ, Gallagher M, Morris TT, *et al.* Acute non-A-E hepatitis in the United States and a role of hepatitis G virus infection. *N Engl J Med* 1997;336:741-746.
43. Alter MJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, *et al.* The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *N Engl J Med* 1997;336:747-754.
44. Thomas DL, Vlahov D, Alter HJ, *et al.* Association of antibody to GB virus C (hepatitis G virus) with viral clearance and protection from reinfection. *J Infect Dis* 1998;177:539-542.
45. Levi JE, Contri DG, Lima LP, Takaoka DT, Garrini RH, Santos W, Fachini R. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003; 45(2):75-78.
46. Ribeiro-dos-Santos G, Nishiya AS, Nascimento CM, *et al.* Prevalence of GB virus C (hepatitis G virus) and risk factors for infection in São Paulo, Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21(6):438-43.
47. Lampe E, Saback FL, Viazov S, Roggendorf M and Niel C. Age-specific prevalence and genetic diversity of GBV-C/hepatitis G virus in Brazil. *J Med Virol* 1998;56:39-43.
48. Schaluder GG, Dawson GJ, Simons NJ, *et al.* Molecular and serologic analysis in the transmission of the GB hepatitis agent. *J Med Virol* 1995;46:81-90.
49. Wejstal R, Manson AS, Widell A and Norkrans G. Perinatal transmission of Hepatitis G Virus (GB Virus Type C) and Hepatitis C Virus infections – A Comparison. *Clin. Infect Dis* 1999;28:816-21.

50. Yoshida M, Okamoto H, Mishiro S. Detection of the GBV-C hepatitis virus genome in serum from patients with fulminant hepatitis of unknown aetiology. *Lancet* 1995;348:1131-1132.
51. Heringlake S, Osterkamp S, Trautwein C, Tillmann HL, *et al.* Association between fulminant hepatic failure and a strain of GBV virus C. *Lancet* 1996;348:1626-1629.
52. Pessoa MG, Terrault NA, Detmer J, Kolberg J, *et al.* Quantification of hepatitis G and C viruses in the liver: evidence that hepatitis G virus is not hepatotropic. *Hepatology* 1998;27:877-880.
53. Tanaka E, Alter HJ, Nakatsuji Y, *et al.* Effect of hepatitis G virus infection on chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 1996;125:740-743.
54. Rambusch EG, Wedemeyer H, Tillmann HL, Heringlake S, Manns MP. Significance of co-infection with hepatitis G virus for chronic hepatitis C – a review of the literature. *Z Gastroenterol* 1998;36:41-53.
55. Fried MW, Khudyakov YE, Smallwood GA, *et al.* Hepatitis G virus co-infection in liver transplant recipients with chronic hepatitis C and non-viral chronic liver disease. *Hepatology* 1997;25:1271-1275.
56. Simons JN, Desai SM, Mushahwar IK. The GB viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;242:341-375.
57. Dickens T, Lemon SM. GB virus C, hepatitis G virus, or human orphan flavivirus? *Hepatology* 1997;25:1285-1286.
58. Jones JF, Kulkarni PS, Butera ST and Reeves WC. GB virus C – a virus without a disease: We cannot give it chronic fatigue syndrome. *BMC Infectious Diseases* 2005;5:78-81
59. Yeo AET, Matsumoto A, Hisada M, Shih JW, Alter HJ and Goedert JJ. Effect of Hepatitis G Virus infection on progression of HIV infection in patients with hemophilia. *Ann Intern Med* 2000;132:959-963.
60. Stapleton JT. GB Virus Type C/Hepatitis G Virus. *Sem Liver Dis* 2003;23(2):137-148.
61. Muerhoff AS, Tillmann HL, Manns MP, Dawson GJ and Desai SM. GB virus C genotype determination in GB virus C/HIV co-infected individuals. *J Med Virol* 2003;70:141-149.
62. Toyoda H, Fukuda Y, Hayakawa T, Takamatsu J and Saito H. Effect of GB virus C/hepatitis G virus coinfection on the course of HIV infection in

hemophilia patients in Japan. *Acquired Immune Defic Syndromes* 1998;17:209-213.

63. Heringlake S, Ockenga J, Tillmann HL, Trautwein C, *et al.* GB virus C/hepatitis G virus infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients? *J Infect Dis* 1998;177:1723-1726.
64. Sabin CA, Devereux H, Kinson Z, *et al.* Effect of co-infection with hepatitis G virus on HIV disease progression in hemophilic men. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1998;19:546-547
65. Sallie R, Shaw J, Mutimer D. GBV-C virus and fulminant hepatic failure. *Lancet* 1996;347:908.
66. Lau DT, Miller KD, Detmer J, *et al.* Hepatitis G virus and human immunodeficiency virus co-infection: response to interferon-alpha therapy. *J Infect Dis* 1999;180:1334-1337.
67. Rey D, Vidinic-Moularde J, Meyer P, *et al.* High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA and antibodies in patients infected with human immunodeficiency virus tipe-1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:721-724.
68. Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Morand-Joubert L, *et al.* Carriage of GB virus C/hepatitis G virus RNA is associated with a slower immunologic, virologic, and clinical progression of human immunodeficiency virus disease in coinfectd persons. *J Infect Dis* 1999;179:783-789.
69. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, *et al.* Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Méd* 2001;345:714-724.
70. Xiang J, Wunschmann S, Diekema DJ, *et al.* Effect of co-infection with GB virus C (hepatitis G virus) on survival among patients with HIV infection. *N Engl J Med* 2001; 345:707-714.
71. Voirin N, Trepo C, Esteve J, Chevallier P, Ritter J, Fabry J and Vanhems P. Effects of co-infection with hepatitis C virus and GB virus C on CD4 cell count and HIV-RNA level among HIV-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2002;16:1556-59.
72. Rodriguez B, Woolley I, Lederman M, Zdunek D, Hess G, Valdez H. Effect of GB virus C coinfection on response to antiretroviral treatment in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 2003;187:504-7.
73. Souza I, Zhang W, Diaz R, Chaloner K, Klinzman D, Stapleton J. Effect of GB Virus C (GBV-C) on antiretroviral therapy (ART). *HIV Med* 2006;7:25-31.

74. Antonucci G, Girardi E, Cozzi-Lepri A, *et al.* Response to HAART and GB virus type C coinfection in a cohort of antiretroviral-naïve HIV-infected individuals. *Antivir Ther* 2005;10:109-17.
75. Maidana MT, Sabino EC and Kallas EG. GBV-C/HGV and HIV-1 coinfection. *BJID* 2005;9(2):120-123.
76. Nattermann J, Nischalke HD, Kupfer B, Rockstroh J, Hess L, Sauerbruch T and Spengler U. *AIDS* 2003;17:1457-1462.
77. Jung S, Knauer O, Donhauser N, Eichenmüller M, Helm M, Fleckenstein B and Reil H. Inhibition of HIV strains by GB virus C in cell culture can be mediated by CD4 and CD8 T-lymphocyte derived soluble factors. *AIDS* 2005;19:1267-1272.
78. Xiang J, Sathar MA, McLinden JH, Klinzman D, Chang Q and Stapleton JT. South African GB Virus C Isolates: interaction between genotypes 1 and 5 isolates and HIV. *Journal of Infectious Diseases* 2005;192:2147-2151.
79. Xiang J., McLinden J.H., Chang Q., Kaufman T.M. and Stapleton J.T. An 85-aa segment of the GB virus type C NS5A phosphoprotein inhibits HIV-1 replication in CD4⁺ Jurkat T cells. *PNAS* 2006; 103:15570-5.
80. Nunnari G, Nigro L, Palermo F, *et al.* Slower progression of HIV-1 infection in persons with GB virus C co-infection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile. *Ann Intern Med* 2003;139:26-30.
81. Birk M, Lindback S, Lidman C. No influence of GB virus C replication on the prognosis in a cohort of HIV-1-infected patients. *AIDS* 2002;16:2482–2485.
82. Brumme ZL, Chan KJ, Dong WWY, *et al.* No association between GB virus-C viremia and virological or immunological failure after starting initial antiretroviral therapy. *AIDS* 2002;16:1929–1933.
83. Flamholz L, Naucier A, Molnegren V, Wallmark E, Widell A. GB virus C during the natural course of HIV-1 infection: viremia at diagnosis does not predict mortality. *AIDS* 2004; 18:324-331.
84. Kaye S, Howard M, Alabi A, Hansmann A, Whittle H, van der Loeff H. No observed effect of GB virus C coinfection in disease progression in a cohort of African women infected with HIV-1 and HIV-2. *Clin Infect Dis* 2005;40:876-8.
85. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, and Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 1992;10:413–417.
86. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, and Watson R. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993;11:1026–1030.

87. Holland PM, Abramson RD, Watson R, and Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1991;88:7276–7280.
88. Lee LG, Connell CR, and Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research* 1993;21:3761–3766.
89. Livak, K. J., Flood, S. J. A., Marmaro, J., Giusti, W., and Deetz, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications* 1995; 4:357–362.
90. Muerhoff A S, Simons J N, Leary T P, Erker J C, *et al.* Sequence heterogeneity within the 5' terminal region of the hepatitis GB virus C genome and evidence for genotypes. *J Hepatol*; 25(3):379-384.
91. Boom R, Sol CJA, Salimans C L, Jansen PME, Wertheim-van Dillen P.M.E. and van der Noordaa J. Rapid and simple Method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;28(3):495-503.
92. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9):2002-07.
93. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Boletim Epidemiológico – AIDS. Ano III nº 01 - 01^a à 26^a semanas epidemiológicas - janeiro a julho de 2006.